

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko.

Kamil Awsiuk

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Doktorat (2013) Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Stopień naukowy doktora nauk fizycznych w zakresie biofizyki (27
czerwca 2013)
Tytuł rozprawy doktorskiej: ***Biomolecular nanolayers on synthetic organic films: their structure and properties for biosensor applications***
Praca wyróżniona

Magisterium (2009) Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Temat pracy magisterskiej: ***Badanie własności powierzchni czynnej biosensorów metodami mikroskopii skaningowej i spektroskopii fotoelektronów***
Praca wyróżniona

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

od listopada 2016 r.

stanowisko adiunkta na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki
Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

od listopada 2013 r. do października 2016 r.

stanowisko asystenta na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki
Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie finansowane z
KNOW

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

Characterization of polymer and molecular surface modifications for biointerface engineering

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

[H1] Awsiuk, K., Budkowski, A., Marzec, M.M., Petrou, P., Rysz, J., Bernasik, A. (2014) Effects of polythiophene surface structure on adsorption and conformation of bovine serum albumin: A multivariate and multitechnique study, **Langmuir**, 30 (46), pp. 13925-13933.

DOI: 10.1021/la502646w

IF=4.457

[H2] Gajos, K., Petrou, P., Budkowski, A., Awsiuk, K., Bernasik, A., Misiakos, K., Rysz, J., Raptis, I., Kakabakos, S. (2015) Imaging and spectroscopic comparison of multi-step methods to form DNA arrays based on the biotin-streptavidin system, **Analyst**, 140 (4), pp. 1127-1139.

DOI: 10.1039/c4an00929k

IF=4.107

[H3] Tsougeni, K., Petrou, P.S., Awsiuk, K., Marzec, M.M., Ioannidis, N., Petrouleas, V., Tserepi, A., Kakabakos, S.E., Gogolides, E. (2015) Direct Covalent Biomolecule Immobilization on Plasma-Nanotextured Chemically Stable, Substrates **ACS Applied Materials and Interfaces**, 7 (27), pp. 14670-14681.

DOI: 10.1021/acsami.5b01754

IF=6.723

[H4] Mavrogiannopoulou, E., Petrou, P.S., Koukouvinos, G., Yannoukakos, D., Sifaka-Kapadai, A., Fornal, K., Awsiuk, K., Budkowski, A., Kakabakos, S.E. (2015) Improved DNA microarray detection sensitivity through immobilization of preformed in solution streptavidin/biotinylated oligonucleotide conjugates, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 128, pp. 464-472.

DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.02.045

IF=4.152

[H5] Awsiuk, K., Budkowski, A., Petrou, P., Marzec, M.M., Biernat, M., Jaworska-Gołab, T., Rysz, J. (2016) Orientation and biorecognition of immunoglobulin adsorbed on spin-cast poly(3-alkylthiophenes): Impact of polymer film crystallinity, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 148, pp. 278-286.

DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.08.028

IF=3.887

[H6] Dimitrakellis, P., Gogolides, E., Zeniou, A., Awsiuk, K., Rysz, J., Marzec, M.M. (2017) Transition between stable hydrophilization and fast etching/hydrophilization of poly(methyl)methacrylate polymer using a novel atmospheric pressure dielectric barrier discharge source, **Journal of Vacuum Science and Technology A: Vacuum, Surfaces and Films**, 35 (4), art. no. 041303.

DOI: 10.1116/1.4984613

IF=1.761

[H7] Stetsyshyn, Y., Raczowska, J., Lishchynskyi, O., Awsiuk, K., Zemla, J., Dąbczyński, P., Kostruba, A., Harhay, K., Ohar, H., Orzechowska, B., Panchenko, Y., Vankevych, P., Budkowski, A. (2018) Glass transition in temperature-responsive poly(butyl methacrylate) grafted polymer brushes. Impact of thickness and temperature on wetting, morphology, and cell growth, **Journal of Materials Chemistry B**, 6 (11), pp. 1613-1621.

DOI: 10.1039/c8tb00088c

IF=4.776

[H8] Stetsyshyn, Y., Awsiuk, K., Kusnez, V., Raczowska, J., Jany, B.R., Kostruba, A., Harhay, K., Ohar, H., Lishchynskyi, O., Shymborska, Y., Kryvenchuk, Y., Krok, F., Budkowski, A. (2019) Shape-

Controlled synthesis of silver nanoparticles in temperature-responsive grafted polymer brushes for optical applications, **Applied Surface Science**, 463, pp. 1124-1133.

DOI: 10.1016/j.apsusc.2018.09.033

IF=4.439

[H9] Awsiuk, K., Petrou, P., Thanassoulas, A., Raczkowska, J., (2019) Orientation of Biotin-Binding Sites in Streptavidin Adsorbed onto the Surface of Polythiophene Films, **Langmuir**, 35, pp. 3058–3066

DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b03509

IF=3.789

[H10] Awsiuk, K., Stetsyshyn, Y., Raczkowska, J., Lishchynskiy, O., Dąbczyński, P., Kostruba, A., Ohar, H., Shymborska, Y., Nastyshyn, S., Budkowski, A., (2019) Temperature-controlled orientation of proteins on temperature-responsive grafted polymer brushes. Poly(butyl methacrylate) versus poly(butyl acrylate): Morphology, wetting and protein adsorption, **Biomacromolecules**, przyjęta do druku

DOI: 10.1021/acs.biomac.9b00030

IF= 5.738

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Characterization of polymer and molecular surface modifications for biointerface engineering

(Charakterystyka modyfikacji powierzchni polimerowych i molekularnych dla inżynierii powierzchni graniczących z układami biologicznymi)

Specyficzne właściwości powierzchni ciała stałego mogą wywoływać pożądane odpowiedzi układów biologicznych w wyniku tworzenia się powierzchni rozdziału faz pomiędzy powierzchnią a takimi układami (ang. *biointerface*).¹ Powierzchnie międzyfazowe, w tym również na granicy układ biologiczny – faza skondensowana, są cienkimi warstwami, których właściwości różnią się od właściwości masowych układów czy faz znajdujących się po obu stronach tego rozdziału.² Możliwe jest sztuczne wytworzenie, za pomocą inżynierii powierzchni ciała stałego, powierzchni między układem biologicznym a fazą skondensowaną i nadanie jej właściwości wpływających na oddziaływanie biomolekuł z podłożem. Na przykład powierzchnie modyfikowane molekułami, tworzącymi samoorganizujące się monowarstwy (ang. *Self-Assembled Monolayers* (SAMs)), i/lub polimerami mogą wprowadzać sygnały środowiskowe wpływające na zachowanie komórek.³ Pożądane właściwości powierzchni między układem biologicznym a fazą skondensowaną mogą być dopasowane („dostrojone”), aby np. zapewnić biokompatybilność materiałów wprowadzonych do organizmu (np. implantów)¹, lub przełączane np. po to, by zdjąć arkusze komórek wyhodowane na termo-przełączalnych podłożach (ang. *cell sheet engineering*)⁴. Kolejnym ważnym obszarem zastosowań powierzchni modyfikowanych polimerami lub molekułami organicznymi⁵ są biomedyczne urządzenia

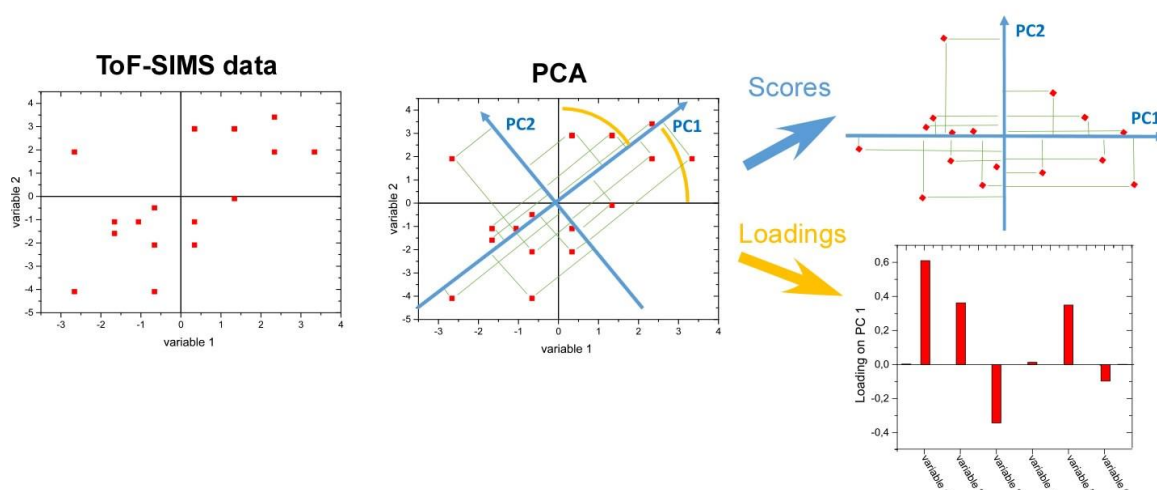
stosowane w diagnostyce, takie jak biosensory^{6,7} czy mikromacierze białkowe lub DNA^{5,8}. Modyfikacje te obejmują nie tylko aktywację powierzchni, np. przy użyciu molekuł SAM, ale również wielokrokową immobilizację różnych biomolekuł (nie tylko tych odpowiedzialnych za detekcję analitu). Przytoczone wyżej przykłady obrazują **cel naukowy** przedłożonego cyklu publikacji (Tabela 1), którym jest *charakterystyka modyfikacji powierzchni polimerowych i molekularnych, tworzących powierzchnie międzyfazowe z układami biologicznymi, o „dostrajalnych” lub przełączalnych właściwościach oraz mających zastosowanie w biosensorach i mikromacierzach*.

Tabela 1. Podsumowanie celu naukowego i osiągniętych wyników zaprezentowanych w autoreferacie.

Publikacja	sekcja	CHARACTERISATION OF				POLYMER & MOLECULAR SURFACE MODIFICATIONS		FOR BIOINTERFACE ENGINEERING	
		Metody powierzchniowe			surface binding assay	polimerowe	molekularne	nowe typy biosensorów i mikromacierze	powierzchnie międzyfazowe o dostrajalnych i przełączalnych właściwościach
		ToF-SIMS	XPS	AFM					
H1	II	PCA				cienkie warstwy		polimery sprzężone	
H2	III	imaging					silany	macierze dna	
H3	I	PCA				warstwy modyfikowane plazmą			dostrajane
H4	III						silany	macierze dna	
H5	II	PCA				cienkie warstwy		polimery sprzężone	
H6	I	PCA				warstwy modyfikowane plazmą			dostrajane
H7	IV					szczepione szczotki	silany		T-przełączalne
H8	IV					szczepione szczotki	silany		T-przełączalne
H9	II	PCA				cienkie warstwy		polimery sprzężone	
H10	IV	PCA				szczepione szczotki	silany		T-przełączalne

Pojawienie się w latach 80. i 90. jak również późniejszy rozwój nowoczesnych technik analizy powierzchni umożliwił nie tylko weryfikację i optymalizację różnych protokołów inżynierii powierzchni między układami biologicznymi a fazą skondensowaną, ale także zbadanie związanych z nimi podstawowych zjawisk międzyfazowych – również na poziomie molekularnym: Mikroskopia sił atomowych (AFM) dostarcza informacji o topografii powierzchni w skali nanometrycznej, ale także ujawnia ułożenie biomolekuł na powierzchni. Z kolei metody spektroskopowe pozwalają ocenić modyfikację powierzchni pod względem zmian stężenia atomowego i stanu chemicznego

(rentgenowska spektroskopia fotoelektronów, XPS). Inną zaletą metod spektroskopowych jest możliwość rozpoznania różnych molekuł, a tym samym detekcja ich obecności i analiza ich rozkładu na powierzchni (spektrometria masowa jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu, ToF-SIMS). Co więcej, w ostatniej dekadzie wykazano, że ToF-SIMS jest również bardzo skuteczną metodą charakteryzowania zmian w konformacji (denaturacji) lub orientacji biomolekuł.^{9,10} Jest to możliwe dzięki zastosowaniu analizy głównych składników (PCA, ang. *Principal Component Analysis*) do jednoczesnej inspekcji natężeń wielu sygnałów ToF-SIMS.^{11,12} Widma ToF-SIMS można przedstawić jako punkty pomiarowe w wielowymiarowej przestrzeni z układem współrzędnych zdefiniowanych jako (scentrowane wokół średnich) natężenia sygnałów (Schemat 1). PCA wyznacza kilka kolejnych kierunków największych nieskorelowanych zmian w analizowanym zbiorze danych, czyli kilka tzw. składników głównych (PC), które tworzą nowy układ współrzędnych. Dzięki temu możemy zmniejszyć wymiarowość zbioru danych, jednocześnie zachowując wszystkie istotne informacje. Rezultatem analizy PCA są widma ToF-SIMS (punkty) opisane przez nowe współrzędne PC na wykresach wyników (wykresów współrzędnych obserwacji; Scores). Natomiast relacje (cosinusy kierunkowe) pomiędzy nowymi osiami PC a oryginalnymi zmiennymi (intensywnościami sygnałów) są opisane na wykresach ładunków (wykresach współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów; Loadings). Wskazują one, które zmienne są odpowiedzialne za różnice pomiędzy punktami pomiarowymi. Mimo ogromnego rozwoju metod analizy powierzchni (w tym użytych tu metod AFM, XPS, ToF-SIMS, PCA), techniki te są często uzupełniane klasycznymi testami diagnostycznymi (opartymi o powierzchniowe wiązanie przeciwciała-antygen czy też hybrydyzację nici DNA), które wykorzystują mikroskopię fluorescencyjną lub pomiary absorbancji w celu uzyskania dodatkowych danych wskazujących na modyfikację aktywności biologicznej biomolekuł.



Schemat 1. Schemat obrazujący analizę PCA.

Wyniki osiągnięte przy realizacji założonego powyżej celu naukowego (*charakterystyka modyfikacji powierzchni polimerowych i molekularnych, tworzących powierzchnie międzyfazowe z*

układami biologicznymi, o „dostrajalnych” lub przełączalnych właściwościach oraz mających zastosowanie w biosensorach i mikromacierzach) zostały zaprezentowane w następującej kolejności (Tabela 1.): I. Najpierw przedstawiono wyniki badań powierzchni polimerowych zmodyfikowanych plazmą. Próbki scharakteryzowano za pomocą XPS i ToF-SIMS w celu oceny grup chemicznych znajdujących się na powierzchni po kolejnych etapach modyfikacji. II. Następnie, opisano wpływ struktury cienkich warstw polimerów sprzężonych na orientację i konformację zaadsorbowanych do nich białek. W tym celu zaproponowano nowe podejścia łączące analizę PCA danych ToF-SIMS z analizą struktury molekuł białka i względną hydrofobowością reszt aminokwasowych. III. Trzecie zaprezentowane zagadnienie dotyczyło weryfikacji trzech różnych protokołów tworzenia macierzy DNA. Przeprowadzona spektroskopowa i mikroskopowa analiza powierzchni, po każdym etapie modyfikacji powierzchni z użyciem wielu różnych molekuł, ujawniła nanostrukturę (AFM), chemię (XPS) i pokrycie molekularne (XPS i ToF-SIMS) zarówno w kropkach DNA, jak i poza nimi, oraz pozwoliła na wskazanie najbardziej skutecznego protokołu immobilizacji DNA. IV. Ostatnie zagadnienie dotyczyło badań nad właściwościami termo-przełączalnych szczotek polimerowych, w tym ich biokompatybilności i wpływu na adsorpcję i orientację zaadsorbowanych białek.

I. „Dostrajanie” właściwości powierzchni polimerowych poprzez modyfikację plazmą [H3 i H6]

Biomolekuły mogą zostać związane z podłożem poprzez adsorpcję fizyczną wykorzystującą wiązania wodorowe oraz oddziaływanie van der Waalsa czy elektrostatyczne lub poprzez wiązanie kowalencyjne z aktywnymi grupami chemicznymi znajdującymi się na tym podłożu. W wyniku tych oddziaływań molekuły nie mogą być usunięte z powierzchni podczas płukania buforem czy detergentem.¹³

Jedną z metod szeroko stosowanych do modyfikacji powierzchni polimerowych przed osadzeniem biomolekuł jest obróbka plazmą. Pozwala ona efektywnie dostosować właściwości powierzchni, takie jak zwilżalność, adhezja czy biokompatybilność w sposób przyjazny dla środowiska i bez wpływu na właściwości masowe materiałów. W większości przypadków w wyniku działania plazmy, poprzez zastosowanie odpowiednich mieszanin gazów, które wytrawiają podłoże lub osadzają się na nim, na powierzchni tworzone są grupy funkcyjne takie jak NH_x, SO_x, C=O, COOH, czy OH.^{14,15} Wprowadzone w ten sposób na powierzchnie grupy funkcyjne mogą następnie zostać wykorzystywane do przyłączania biomolekuł za pomocą odpowiedniej reakcji chemicznej. Niestety tak zmodyfikowane powierzchnie muszą być stosowane zaraz po obróbce plazmą, gdyż wytworzone grupy funkcyjne są niestabilne w czasie.¹⁴ Zjawisko to jest często określane jako starzenie się i obserwowany jest powrót właściwości hydrofobowych powierzchni.

Prace [H3] i [H6] przedstawiają wyniki badań nad modyfikacją powierzchni poli(metakrylanu metylu) z wykorzystaniem plazmy tlenowej [H3] oraz atmosferycznej plazmy helowej i helowo-tlenowej [H6].

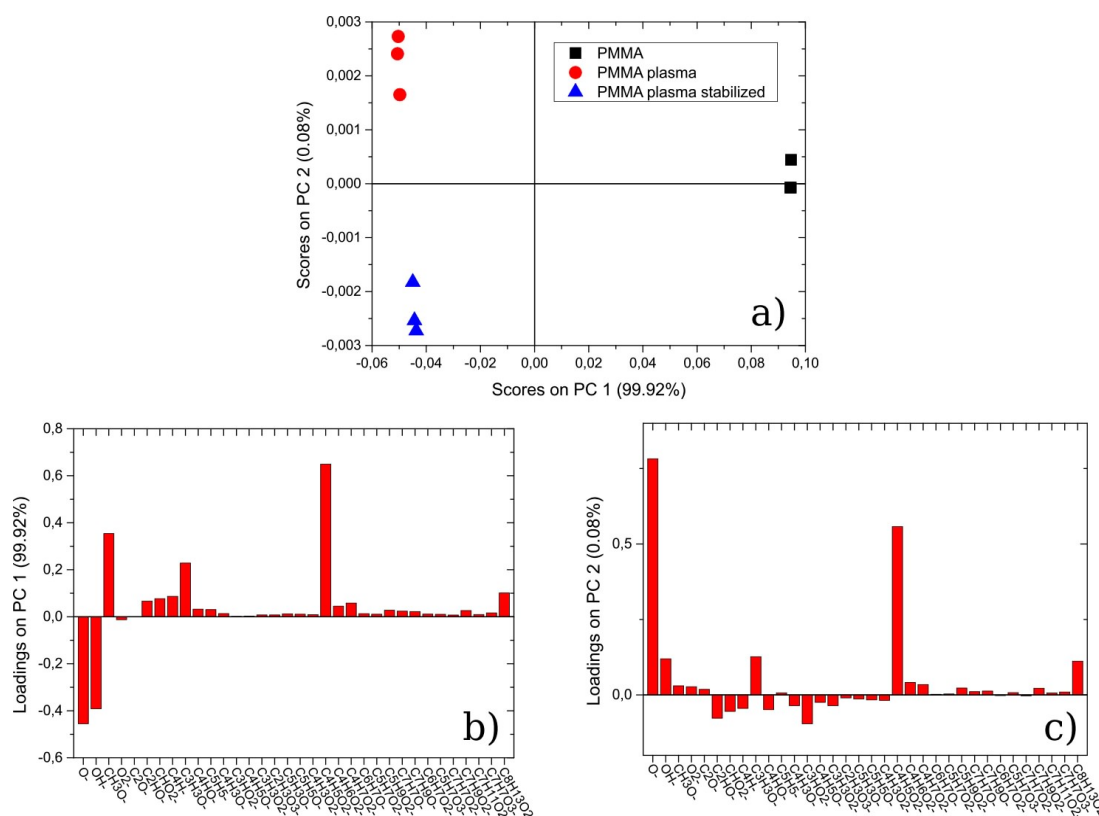
W pracy [H6] zaprezentowano „dostrajanie” przejścia między stabilną hydrofilowością a wysoką szybkością trawienia z jednoczesną hydrofilizacją warstw PMMA w środowisku naturalnym poprzez dostosowanie ilości tlenu w gazie roboczym, jakim był hel. Efektywniejsza hydrofilizacja powierzchni PMMA zmodyfikowanych plazmą helową związana jest z wyższym stężeniem azotu ujawnionym w badaniach XPS i ToF-SIMS. Pomiary kąta zwilżania wody ujawniły spadek kąta z $\sim 69^\circ$ dla czystego PMMA do $\sim 28^\circ$ i $\sim 40^\circ$ dla powierzchni zmodyfikowanych odpowiednio plazmą helową i helowo tlenową. Wartości te ustabilizowały się po 10 dniach na poziomie $\sim 40^\circ$ i $\sim 50^\circ$ i pozostały stałe przez ok. 45 dni. Co więcej, optyczna spektroskopia emisyjna plazmy ujawniła silną korelację pomiędzy kompozycją fazy gazowej a zwiększoną obecnością azotu i jednocześnie niższą zawartością tlenu na powierzchni PMMA zmodyfikowanych plazmą He w porównaniu do plazmy helowo-tlenowej. Widma XPS ujawniły również możliwą częściową podmiangę grup estrowych PMMA grupami amidowymi dla próbek traktowanych plazmą helową, podczas gdy dla warstw PMMA zmodyfikowanych plazmą helowo-tlenową obserwowane jest zwiększone utlenianie powierzchni, co w połączeniu z większymi szybkościami trawienia ($\sim$ cztery razy wyższy niż dla czystego helu) wskazuje na inny mechanizm modyfikacji powierzchni.

W publikacji [H3] zaprezentowano nową metodę wiązania kowalencyjnego białek (w tym Immunoglobuliny G (IgG)) do powierzchni polimerów z topografią mikronanoskopową indukowaną plazmą i stabilną w czasie funkcjonalnością chemiczną. Zostało to osiągnięte za pomocą krótkiego (1–5 minut) wytrawiania i jednoczesnego procesu tworzenia tekstur o rozmiarach mikro- i nano-skopowych przy użyciu plazmy tlenowej, po którym następuje szybki etap wygrzania powierzchni. Wygrzanie powierzchni indukuje przyspieszone odzyskiwanie hydrofobowości przy jednoczesnym zachowaniu istotnych grup chemicznych wytwarzanych przez plazmę – stabilizuje powierzchnię.

W celu wykazania zdolności do kowalencyjnego wiązania molekuł do powierzchni PMMA trawionych plazmą wykorzystano różne pochodne biotyny zaprojektowane tak by były zdolne do tworzenia wiązań kowalencyjnych z grupami karboksylowymi ($-\text{COOH}$) lub karbonyłowymi ($\text{C}=\text{O}$). Kowalencyjna immobilizacja biotyny i jej pochodnych została następnie zweryfikowana poprzez wiązanie specyficzne ze znakowaną fluorescencyjnie streptawidyną. Przeprowadzone pomiary fluorescencji dla powierzchni PMMA zmodyfikowanych plazmą ujawniły duże natężenie fluorescencji w porównaniu do niemodyfikowanych warstw, co wskazuje na obecność zarówno grup karbonylowych, jak i karboksylowych na powierzchni reagującymi z odpowiednimi pochodnymi biotyny. Istnieje jednak wyraźna różnica pomiędzy wygrzаныmi i niewygrzаныmi powierzchniami PMMA poddanyymi modyfikacji plazmą. Wygrzane podłoża wykazują mniejszą ilość grup karbonylowych, których ilość maleje z czasem, podczas gdy liczba grup karboksylowych pozostaje stabilna przez okres 180 dni. Z drugiej strony dla niewygrzanych próbek, zarówno ilość grup karbonylowych, jak i karboksylowych stale maleje z czasem, a ich liczba zmniejsza się o około 70% po 180 dniach w stosunku do wartości początkowych oszacowanych dla świeżo przygotowanych powierzchni.

Przeprowadzone badania XPS i ToF-SIMS dostarczyły informacji o składzie chemicznym powierzchni stabilizowanych i niestabilizowanych próbek modyfikowanych plazmą.

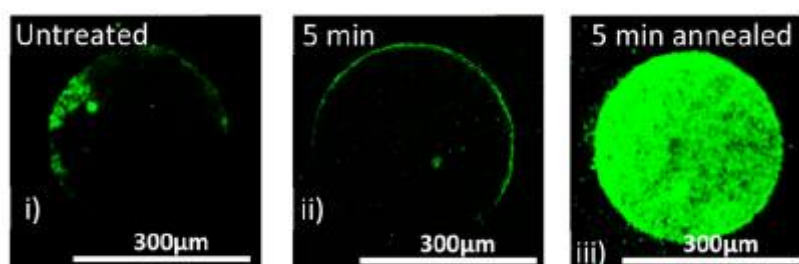
Analiza wyników (współrzędnych obserwacji) PCA dla danych ToF-SIMS (Rys. 1-H3 a) wyraźnie rozdzieliła pomiary dla niezmodyfikowanej powierzchni PMMA (posiadającej dodatnią wartość dla pierwszego głównego składnika PC1) od danych uzyskanych dla powierzchni zmodyfikowanych plazmą (ujemne wartości na PC1). Analiza ładunków (współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów) (Rys. 1-H3 b) ujawniła, że różnice te spowodowane są wyższą intensywnością jonów wtórnych O^- , OH^- oraz O_2^- dla próbek zmodyfikowanych plazmą. Wynik ten jest zgodny z pomiarami XPS, które ujawniły ~26% tlenu dla czystych podłoży PMMA i ~50% tlenu dla powierzchni traktowanych plazmą tlenową. Co więcej, drugi główny składnik PC2 rozdzielił pomiary dla próbek stabilizowanych i niestabilizowanych, wskazując na wzrost intensywności jonów wtórnych będących fragmentami alifatycznymi (np. C_4H^-) (Rys. 1-H3 c) dla powierzchni wygrzanych, i sygnałów zawierających tlen dla podłoży tylko zmodyfikowanych plazmą. Analiza próbek za pomocą XPS ujawniła również ok. dwa razy wyższą frakcję wiązań alifatycznych (C-C) na powierzchniach wygrzanych. Wyniki otrzymane przy pomocy ToF-SIMS i XPS zostały dodatkowo potwierdzone badaniami kąta zwilżania, które wykazały większą hydrofobowość powierzchni stabilizowanych.



Rysunek 1-H3. Analiza głównych składników danych ToF-SIMS. (a) Wykres wyników (współrzędnych obserwacji; Scores) sporządzony dla dwóch pierwszych głównych składników PC1 vs PC2 wyraźnie pokazuje rozdzielone trzy grupy punktów odpowiadających każdemu typowi próbek. Pierwszy główny składnik (PC1) oddziela niemodyfikowany PMMA, mający dodatnie wartości PC1,

od próbek traktowanych plazmą o ujemnych wartościach na osi PC1. Z kolei PC2 ujawnia różnicę między próbkami poddanymi obróbce plazmą a próbkami poddanymi obróbce plazmą i wygrzany. Wykresy ładunków (współczynników wkładu od poszczególnych sygnałów; Loadings) dla (b) PC1 i (c) PC2.

Dodatkowe prace skupiły się nad zbadaniem zdolności powierzchni zmodyfikowanych plazmą tlenową i stabilizowanych do kowalencyjnego związania białek. Jako modelowe białko użyto króliczego IgG, a jego efektywna immobilizacja na powierzchni była wykrywana poprzez reakcję ze znakowanym fluorescencyjnie (AlexaFluor 488) przeciwciałem przeciw króliczemu IgG. W końcowym etapie badań pokazano możliwość wykorzystania powierzchni PMMA, modyfikowanych i teksturowanych plazmą a następnie stabilizowanych, jako substratów do oznaczeń immunologicznych poprzez opracowanie testów immunologicznych do wykrywania białka C-reaktywnego (CRP) (Rys. 2-H3) i lipopolisacharydów (LPSs) salmonelli.



Rysunek 2-H3. Obrazy fluorescencyjne obszarów odpowiadających detekcji CRP dla roztworu o stężeniu 50 ng / ml) dla testu immunologicznego przeprowadzonego na powierzchni PMMA: (i) nie poddanej modyfikacji, (ii) modyfikowanej plazmą tlenową oraz (iii) modyfikowanej plazmą tlenową i wygrzanej.

Podsumowanie wyników badań zaprezentowanych w pracach [H3 i H6]

Opracowano nowe metody modyfikacji powierzchni PMMA z wykorzystaniem plazmy tlenowej [H3] oraz atmosferycznej plazmy helowej i helowo-tlenowej [H6]. Dodatkowo zweryfikowano procedurę polegającą na szybkim wygrzaniu próbek po modyfikacji plazmą w celu uzyskania stabilnej w czasie funkcjonalności chemicznej powierzchni. Wreszcie, biomolekuły, w tym przeciwciała i inne białka, zostały związane kowalencyjnie na podłożach zmodyfikowanych plazmą tlenową i stabilizowanych poprzez wygrzanie wykazując jednocześnie dużą gęstość powierzchniową. W obu pracach metody XPS i PCA danychToF-SIMS ujawniły obecność na powierzchni różnych grup chemicznych i pokazały różnicę w modyfikacji chemicznej między różnymi protokołami.

Badania spektroskopowe powierzchni modyfikowanych plazmą (których byłem koordynatorem) zostały przeprowadzone dzięki akcji FOCUS (81/F/KA/2015) w ramach projektu

KNOW finansowanego przez MNiSW (7150/E-338/M/2015). Próbki zostały przygotowane przez grupę dr Evangelosa Gogolides z the Institute of Nanoscience and Nanotechnology, NCSR “Demokritos”.

II. Oddziaływanie białek z powierzchnią polimeru sprzężonego w aspekcie zastosowań w nowych biosensorach [H1, H5 i H9]

W pracach [H1, H5 i H9] zostały opisane wyniki badań nad adsorpcją białek do powierzchni cienkich warstw polimerów sprzężonych.

Rodzina polimerów sprzężonych została wybrana z powodu ich szerokiego zastosowania w „plastikowej” elektronice. Jednym z kierunków rozwoju „plastikowej” elektroniki jest konstrukcja biosensorów pozwalających na selektywną detekcję nawet niewielkich ilości analitów. Większość tych urządzeń bazuje na organicznych tranzystorach polowych (organic field effect transistors (OFET)). Polimerem najczęściej wykorzystywanym do konstrukcji biosensorów bazujących na OFET jest poli(3-heksylotiofen) należący do rodziny politiofenów (PT). Łańcuch główny molekuly politiofenu składa się z pierścieni tiofenowych, do których przyłączone są grupy boczne modyfikujące właściwości polimeru. Szczególną grupą wśród PT szeroko badaną są poli(3-alkilotiofeny) (P3AT), w których do pierścienia tiofenowego przyłączony jest łańcuch alkilowy zapewniający rozpuszczalność polimerów. Ponieważ molekula pojedynczego meru nie jest symetryczna kolejne mery w P3AT mogą być połączone na trzy sposoby głowa-ogon (head-to-tail, HT), głowa-głowa (head-to-head, HH) lub ogon-ogon (tail-to-tail, TT). Polimery zawierające połączenia tylko typu HT określane są jako regioregularne. Regioregularne P3AT mają tendencję do krystalizacji co znacząco wpływa na ich przewodnictwo elektryczne, które dla polimerów nieregularnych o losowym połączeniu merów waha się w granicach 0,1-10 S/cm, podczas gdy regioregularne P3AT osiągają przewodność od 150 do 1000 S/cm.¹⁶

Przegląd literatury ujawnia wiele prac opisujących badania biosensorów bazujących na OFET, w których oddziaływanie pomiędzy analitem a warstwą detekcyjną osadzoną na powierzchni półprzewodnika organicznego^{17,18,19} modyfikują charakterystyczne parametry urządzenia np. napięcie progowe czy ruchliwość ładunku²⁰. W wielu zastosowaniach biomedycznych, takich jak sensory glukozy²¹, DNA²² lub białka⁶, warstwa półprzewodnikowa OFET składa się z PT, często z regioregularnego poli(3-heksylotiofenu) (RP3HT). Jednak dotychczasowe badania nad biosensorami opartymi na PT rzadko koncentrują się na wpływie struktury warstwy polimerowej na właściwości adsorbowanych białek.

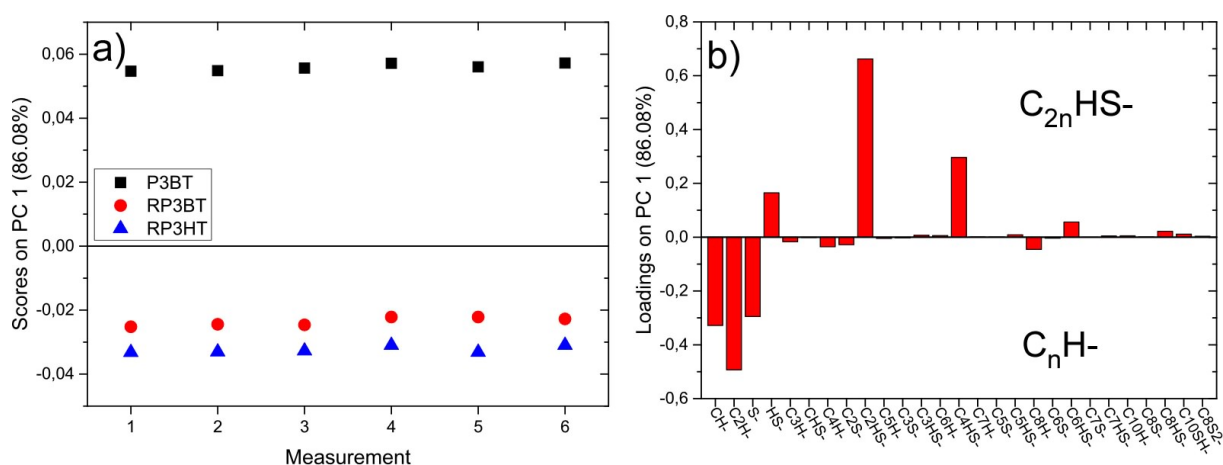
W trakcie procesu adsorpcji do powierzchni molekuly białka mogą zmienić swoją konformację²³ lub przybrać różne orientacje^{24,25,26,11,27}. Białka osiadając na powierzchni mogą przybrać losową orientację lub preferować wystawienie jednego z fragmentów na zewnątrz. Dobór orientacji determinuje liczbę miejsc wiążących na powierzchni białka eksponowanych do środowiska zewnętrznego, a tym samym ma ogromny wpływ na czułość i selektywność biosensorów.

Białkami najczęściej wykorzystywanymi do konstrukcji biosensorów są: albumina surowicy bydlęcej (BSA), Immunoglobuliny G (IgG) oraz streptawidyna. BSA jest powszechnie stosowana do blokowania wolnych miejsc na powierzchni biosensora lub do pośredniego wprowadzenia na powierzchnię molekuł o małej masie cząsteczkowej poprzez skoniugowanie ich z molekułą BSA. IgG tworzą najliczniejszą klasę przeciwciał w organizmie ludzkim i odgrywają kluczową rolę w układzie odpornościowym. Są one odpowiedzialne za rozpoznawanie antygenów i ze względu na wysoką specyficzność i selektywność reakcji między antygenem a przeciwciałem, testy immunologiczne są wykorzystywane rutynowo nie tylko w laboratoriach diagnostycznych, ale także w budowie biosensorów. Streptawidyna jest powszechnie stosowanym białkiem ze względu na jej wysokie powinowactwo do biotyny. Wiązanie streptawidyna-biotyna jest jednym z najsilniejszych, niekowalencyjnych połączeń i jest powszechnie stosowane do tworzenia struktur wielowarstwowych i immobilizacji na powierzchni różnych biomolekuł znakowanych biotyną.^{14,29,16} Dzięki temu biotynylowane biomolekuły są łatwiej dostępne podczas reakcji. Układ biotyna-streptawidyna został m. in. zastosowany do immobilizacji przeciwciał w sposób kontrolowany³¹, zwiększając tym samym czułość testu immunologicznego³² w porównaniu do testu z losowo biotynylowanymi przeciwciałami. Badania nad orientacją oraz konformacją tych białek zaadsorbowanych do cienkich warstw politiofenów przedstawiono w pracach [H1, H5 i H9].

Pierwszy etap prac polegał na zbadaniu właściwości cienkich warstw PT. Polimerami użytymi w trakcie tych badań były: nieregulegularny poli(3-butylofiofen) (P3BT), regulegularne poli(3-heksylofiofen) (RP3HT) i poli(3-butylofiofen) (RP3BT) oraz poli(3,3'-didodecylo-quatertiofen) (PQT12). Roztwory polimerów przygotowano z użyciem rozpuszczalników o niskiej prężności par takich jak chlorobenzen ($P_{vp} = 1.2$ kPa), toluen ($P_{vp} = 2.9$ kPa) czy tiofen ($P_{vp} \sim 8.3$ kPa) a następnie wytworzono cienkie warstwy polimerowe metodą odlewania na wirujący podkład (ang. Spin coating). W celu zminimalizowania jakichkolwiek efektów związanych z resztkami rozpuszczalnika pozostającymi w warstwie polimerowej wytworzone warstwy zostały wygrzane przez jedną godzinę w temperaturze 60 °C. Tak przygotowane warstwy scharakteryzowano przy użyciu AFM, ToF-SIMS, XPS oraz metodą dyfrakcji promieniowania X padającego pod małymi kątami (grazing incidence X-ray diffraction technique (GIXD)).

W celu detekcji subtelnych różnic chemii powierzchni pomiędzy różnymi P3AT zastosowano wielowymiarową analizę głównych składników danych otrzymanych z pomiarów ToF-SIMS (Rys. 3-H5). PCA zastosowano do jednoczesnej inspekcji natężeń wielu sygnałów negatywnie naładowanych jonów wtórnych pochodzących od łańcucha głównego, zbudowanego z pierścieni tiofenowych, jak również fragmentów bocznych łańcuchów alkilowych. Pierwszy główny składnik (PC1) rozróżnił punkty pomiarowe dla P3BT od widm zebranych dla regulegularnych P3AT (RP3HT i RP3BT) (Rys. 3-H5 a). Wykryte różnice pomiędzy tymi powierzchniami wynikają z różnej intensywności: jonów wtórnych $C_{2n}HS^-$ ($n = 0-5$, większa intensywność dla widm P3BT) – będących fragmentami łańcucha głównego (z możliwymi również fragmentami łańcuchów bocznych), oraz jonów $C_{2n}H^-$ ($n = 1-3$,

większa intensywność dla widm RP3BT i RP3HT) - pochodzących od bocznych łańcuchów alkilowych (oraz jonu S^- z pierścienia tiofenowego) (Rys. 3-H5 b)). W celu wyjaśnienia otrzymanych wyników PCA należy uwzględnić, że głębokość próbkowania metody ToF-SIMS jest ograniczona zaledwie do zewnętrznych regionów warstwy i wynosi ok 1-1.5 nm. Wyższa intensywność jonów $C_{2n}HS^-$ i niższa intensywność jonów C_nH^- w widmach zebranych dla P3BT w porównaniu do RP3BT i RP3HT wskazuje na ekspozycję łańcucha głównego do powierzchni w warstwie nieregularnego P3BT. Zaś w przypadku regioregularnych P3AT to grupy alkilowe ekspozowane są do powierzchni, osłaniając tym samym łańcuch główny skryty głębiej w warstwie polimerowej. Takie ułożenie grup alkilowych wskazuje, że molekuly polimeru przybierają orientację „edge-on”, co prowadzi do ich krystalizacji w warstwie RP3BT i RP3HT, zaś warstwa P3BT wykazuje strukturę amorficzną.



Rysunek 3-H5. Analiza PCA danych otrzymanych z widm negatywnych jonów wtórnych PT. (a) Wartości współrzędnych (Scores) PC1 obserwacji pomiarowych dla warstw P3BT (kwadraty), RP3BT (koła) i RP3HT (trójkąty) wylanych na wirujące podłoże z chlorobenzenu i następnie wygrzanych. (b) Wykres współczynników wkładu (Loadings) do pierwszego składnika głównego PC1 od poszczególnych sygnałów masowych ToF-SIMS. Dodatnie wartości PC1 są wynikiem większych intensywności jonów $C_{2n}HS^-$ ($n = 0-5$) zaś ujemne wartości PC1 odpowiadają większym intensywnościom jonów C_nH^- ($n = 1-5$) (oraz S^-).

Aby potwierdzić otrzymane wyniki przeprowadzono dodatkowe badania za pomocą GIXD i AFM. Obie te metody ujawniły istnienie porządku krystalicznego w warstwach regioregularnych polimerów P3AT i strukturę amorficzną dla P3BT. Co więcej położenie pików bragowskich w widmie GIXD pozwoliło na oszacowanie odległości międzypłaszczyznowych, które wyniosły ~ 1.26 nm i ~ 1.65 nm odpowiednio dla RP3BT i RP3HT. Otrzymane wartości bardzo dobrze zgadzają się z prezentowanymi w publikacjach wartościami dla płaszczyzny (100) krystalitów o orientacji „edge-on”³³, co dodatkowo potwierdza analizę danych ToF-SIMS. Przeprowadzone badania zaprezentowały możliwość stosowania ToF-SIMS w połączeniu z PCA do weryfikacji krystalizacji w warstwach polimerowych.

Następny krok badań polegał na analizie struktury warstw białek zaadsorbowanych do powierzchni różnych PT. W tym celu scharakteryzowano te warstwy z użyciem AFM, XPS, testu immunoenzymatycznego (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)) oraz PCA danych ToF-SIMS.

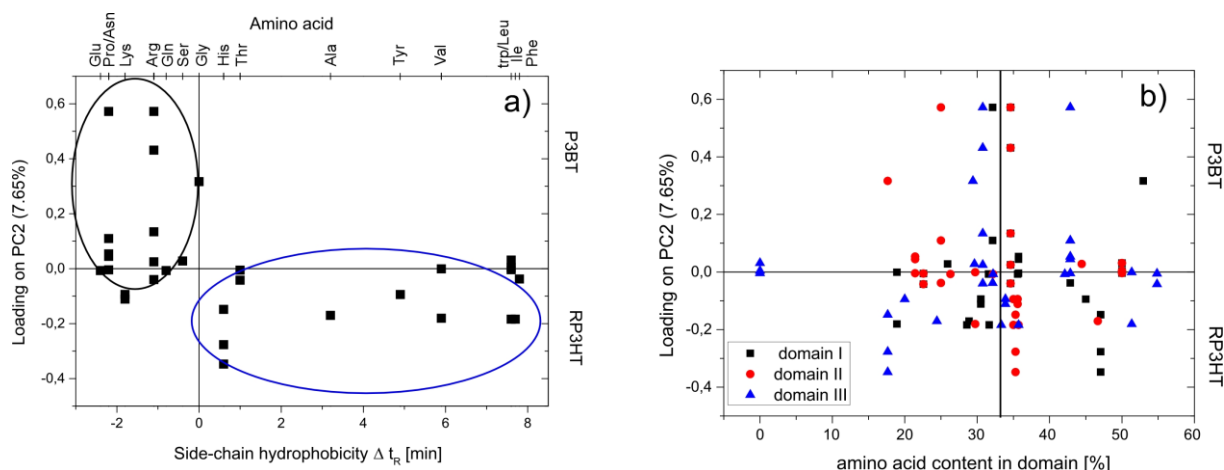
Jako pierwszą zbadano adsorpcję BSA do cienkich warstw RP3HT i P3BT [H1]. W celu wykrycia różnic w składzie aminokwasowym fragmentów białek eksponowanych w zewnętrznych regionach warstwy BSA przeprowadzono analizę PCA zestawu sygnałów ToF-SIMS pochodzących tylko od aminokwasów. Subtelne różnice w chemii zewnętrznej warstwy zaadsorbowanych białek, ujawnione przez analizę PCA danych ToF-SIMS, mogły zostać indukowane przez oddziaływanie białko-podłoże powodujące zmiany w orientacji lub konformacji zaadsorbowanych molekuł. By rozróżnić te dwa efekty wyniki PCA przeanalizowano za pomocą dwóch modeli uwzględniających modyfikacje konformacji i niezależnie zmiany orientacji BSA (Rys. 4-H1).

Prezentowane dotychczas wyniki badań ToF-SIMS (w połączeniu z PCA) nad zmianą konformacji białek osadzonych na różnych podłożach bazowały głównie na prostym podziale aminokwasów na hydrofobowe i hydrofilowe.^{34,35,36,37} W pracy [H1] zostało przedstawione bardziej rygorystyczne podejście wprowadzone przez Monera i in.³⁸, które wykorzystuje względną miarę hydrofobowości łańcuchów bocznych aminokwasów. Względna miara hydrofobowości bazuje na wynikach chromatografii odwróconej fazy (RPC, ang. reversed phase chromatography) i jest zdefiniowana jako różnica czasu retencji Δt_R dla peptydu glicyny, a peptydu różniącego się tylko jedną resztą aminokwasową.³⁸ Dla każdego z 17 aminokwasów, których fragmenty zostały zidentyfikowane w widmie ToF-SIMS, względna miara hydrofobowości łańcucha bocznego została wykreślono na Rys. 4-H1 a) względem wartości ładunków (Loadings) na PC2 dla jonów wtórnych odpowiadającym fragmentom tego aminokwasu. Wykres ten wyraźnie prezentuje (zaznaczone elipsy), że aminokwasy występujące w regionach eksponowanych przez molekuły BSA osadzonych na P3BT (dodatnie wartości ładunków na PC2) są bardziej hydrofilowe ($\Delta t_R < 0$), zaś aminokwasy występujące w regionach eksponowanych przez BSA na RP3HT (ujemne wartości Loadings na PC2) są bardziej hydrofobowe ($\Delta t_R > 0$) w porównaniu do glicyny. Otrzymane wyniki wskazują na zmiany w konformacji BSA spowodowane oddziaływaniem z podłożem. Ponieważ hydrofobowe aminokwasy w natywnej formie białka zazwyczaj ukryte są głęboko w jego strukturze, ich obecność w zewnętrznych regionach warstwy BSA zaadsorbowanego do powierzchni RP3HT (ujawniona przez PCA danych ToF-SIMS) wskazuje na większą denaturację molekuł w porównaniu do BSA na P3BT.

Molekuła BSA składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego tworzącego trzy domeny. Kolejna przeprowadzona analiza polegała na weryfikacji czy obserwowane różnice nie są spowodowane ekspozycją różnych domen indukowaną oddziaływaniem z podłożem. W tym celu porównano zawartość aminokwasów we wszystkich domenach z wynikami PCA. Dla każdego aminokwasu, którego fragmenty obserwowano w widmie masowym, jego względna zawartość w domenie I, II i III (oznaczonej różnymi symbolami) została wykreślona na Rys. 4-H1 b) względem wartości ładunków

(Loadings) na PC2 dla jonów pochodzących od tego aminokwasu. Analizując otrzymany wykres (Rys. 4-H1b)) nie można wskazać korelacji łączącej wyniki PCA z indukowanymi przez warstwę polimeru zmianami orientacji zaadsorbowanych molekuł BSA.

Wyniki uzyskane dzięki PCA danych ToF-SIMS są zgodne z wynikami otrzymanymi przy użyciu innych metod badawczych. Zwiększona ekspozycja hydrofobowych reszt aminokwasowych umożliwia oddziaływania pomiędzy adsorbowanymi molekułami BSA³⁹, co jest zgodne z obserwowaną izotermą adsorpcji typu Freundlicha (z XPS). Prowadzi to również do tworzenia klastrów białkowych obserwowanych jako nieciągłości pokrycia na obrazach AFM. Z kolei silniejsza deformacja białka odpowiedzialna jest również za mniejszą ilość zaadsorbowanych molekuł BSA (z XPS).



Rysunek 4-H1. Analiza PCA przeprowadzona dla sygnałów od aminokwasów obecnych w zewnętrznych regionach warstwy BSA zaadsorbowanej do P3BT (dodatnie wartości na PC2) i RP3HT (ujemne wartości na PC2). (a) Ładunki (Loadings) na PC2 wykreślone w funkcji względnej miary hydrofobowości łańcuchów bocznych aminokwasów - zdefiniowanej jako różnica czasu retencji Δt_R dla peptydu glicyny a peptydu różniącego się tylko jedną resztą aminokwasową.³⁸ Aminokwasy charakterystyczne dla ekspozowanych regionów molekuły BSA zaadsorbowanej do P3BT i RP3HT wykazują własności, odpowiednio, bardziej hydrofilowe i hydrofobowe niż glicyna (co zaznaczono na wykresie elipsami). (b) Analogicznie wykres ładunków (Loadings) na PC2 w funkcji względnej zawartości danego aminokwasu w domenie I (kwadraty), II (koła) i III (trójkąty).

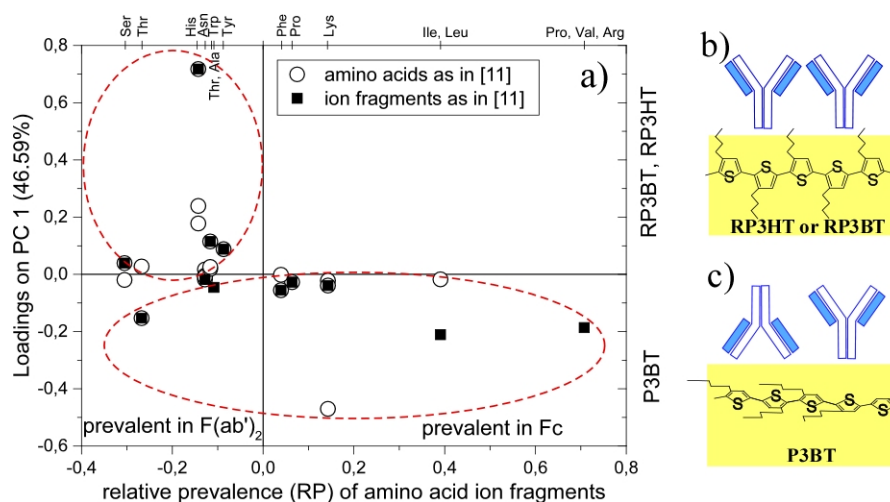
Kolejna praca [H5] skupiła się na badaniach adsorpcji IgG do cienkich warstw P3AT i odpowiedzi na pytanie czy amorficzna struktura P3BT i semikrystaliczna RP3BT i RP3HT wpływa na orientację immunoglobuliny? Okazało się, że dla P3BT i RP3BT składających się z tych samych merów, ale różniących się ich połączeniem (regioregularnością) zaobserwowano różnice w orientacji i aktywności biologicznej IgG spowodowaną zmianami w strukturze warstwy polimerowej. Co więcej efekt ten został również przeanalizowany pod kątem wpływu różnej długości łańcucha alkilowego przy użyciu RP3BT i RP3HT.

Analiza PCA danych z widm ToF-SIMS, zebranych dla białka zaadsorbowanego do powierzchni różnych P3AT (Rys. 5-H5), wyraźnie rozróżniła aminokwasy dominujące w zewnętrznych regionach molekuly króliczego IgG osadzonego na warstwach RP3BT i RP3HT od tych osadzonych na P3BT. Aby zinterpretować te subtelne różnice, wyniki PCA przeanalizowano pod kątem różnych orientacji molekuł IgG.

Bazując na danych z pomiarów XPS założono dwie możliwe orientacje: „end-on” i „head-on”, które powodują różną ekspozycję fragmentów $F(ab')_2$ i Fc do powierzchni. Najprostszy model rozróżnienia pomiędzy tymi orientacjami („end-on” i „head-on”) zakłada analizę udziału procentowego każdego z aminokwasów we fragmentach $F(ab')_2$ i Fc.^{11,40} Jednak niektóre sygnały ToF-SIMS nie są charakterystyczne tylko dla jednego aminokwasu ale dwóch lub nawet trzech różnych aminokwasów. Z tego względu zaproponowano bardziej ogólny parametr, odnoszący się do wszystkich sygnałów ToF-SIMS i zarazem zgodny ze stosunkiem $F(ab')_2/Fc$.¹¹ W modelu użyto względną częstość występowania (RP, ang. *relative prevalence*) fragmentów aminokwasów (jonów wtórnych) pochodzących z $F(ab')_2$ w porównaniu z Fc i wykreślono ją względem otrzymanych ładunków (Loadings) na PC2 (Rys. 5-H5 a). Parametr RP został zdefiniowany na podstawie wyników zaprezentowanych przez Wang i in.¹¹ i bazuje na analizie PCA widm ToF-SIMS zebranych dla modelowych przeciwciał jak również referencyjnych fragmentów $F(ab')_2$ (ujemna wartość RP) i Fc (dodatnia wartość RP). Rys. 5-H5 a) prezentuje porównanie parametru RP z ładunkami (Loadings) na PC1 otrzymanymi w trakcie badań [H5] dla identycznych jonów wtórnych (kwadraty) lub aminokwasów (okręgi). Bazując na otrzymanym wykresie (Rys. 5-H5 a)) można stwierdzić, że IgG zaadsorbowane do regioregularnych polimerów P3AT bardziej eksponują region $F(ab')_2$ przyjmując orientację „end-on” (Rys. 5-H5 b), podczas gdy molekuly osadzone na nieregulegularnym P3BT wykazują mieszaną orientację „end-on”/„head-on” (Rys. 5-H5 c).

Dodatkowe badania z użyciem testu ELISA ujawniły, że wiązanie przeciwciała anty-króliczego z zaabsorbowanym IgG królika jest wyższe (nawet do 71%), gdy test immunologiczny jest przeprowadzany dla IgG zaadsorbowanego do powierzchni regioregularnych polimerów P3AT niż do powierzchni P3BT o amorficznej strukturze. W szczególności najwyższą skuteczność biodetekcji zaobserwowano dla powierzchni RP3BT z bardziej rozwiniętą strukturą krystaliczną.

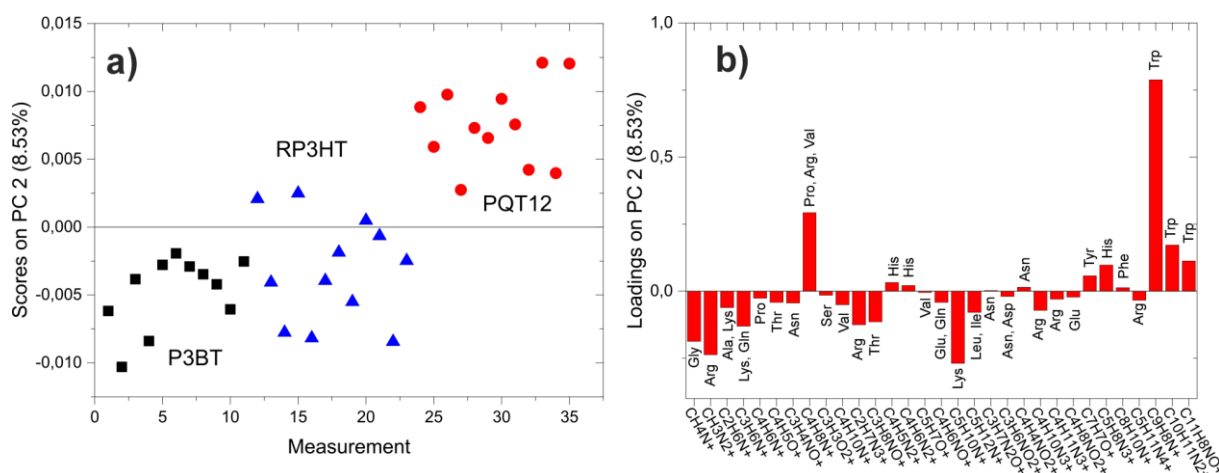
Przeprowadzone badania ujawniły również inny interesujący aspekt. Mianowicie wskazują, że orientacja molekuł białka jest spowodowana przez oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy podłożem a momentem dipolowym molekuly IgG.



Rysunek 5-H5. (a) Ładunki (Loadings) na PC1, odpowiadające molekułom IgG zaadsorbowanym do powierzchni regioregularnych polimerów P3AT (dodatnie wartości PC1) i nieregulegularnego P3BT (ujemne wartości PC1), wykreślone w funkcji parametru RP dla fragmentów aminokwasów pochodzących z regionów F(ab')₂ i Fc. Parametr RP został zdefiniowany na podstawie wyników PCA widm ToF-SIMS zebranych dla modelowych przeciwciał jak również ich referencyjnych fragmentów F(ab')₂ (ujemna wartość RP) i Fc (dodatnia wartość RP)¹¹. Elipsami zaznaczono ekspozycję fragmentów F(ab')₂ przeciwciał na RP3BT i RP3HT wskazując na dominującą orientację „end-on” (b), zaś dla P3BT eksponowane są zarówno fragmenty Fc i F(ab')₂ sugerując mieszaną orientację „end-on”/„head-on” (c).

Wyniki badań zaprezentowanych w pracach [H1 i H5] ujawniły silny wpływ struktury warstwy polimeru (amorficzna vs. semikrystaliczna) na orientację i konformację molekuł białek zaadsorbowanych do tych warstw. W publikacji [H9] efekt ten został przebadany dla streptawidyny zaadsorbowanej do cienkich warstw trzech polimerów przewodzących P3BT, RP3HT i PQT12.

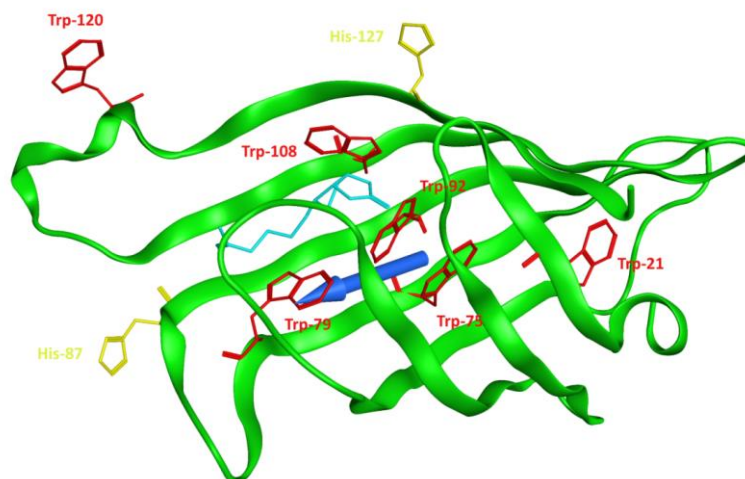
Również w tych badaniach analiza PCA danych ToF-SIMS ujawniła różnice w warstwie białka osadzonej na różnych polimerach (Rys. 6-H9 a). Widma ToF-SIMS streptawidyny zaadsorbowanej do powierzchni PQT12 wskazują wyższą intensywność sygnałów pochodzących od tryptofanu i histydyny (Rys. 6-H9 b). Oznacza to, że molekuły streptawidyny eksponują regiony bogate w te reszty aminokwasowe do środowiska zewnętrznego. Aby sprawdzić, czy zaobserwowane różnice wynikają ze zmian konformacyjnych, zastosowano model zaprezentowany dla BSA w pracy [H1]. Uzyskane wyniki nie wykazały jednak żadnej korelacji pomiędzy danymi z PCA a zmianami konformacji streptawidyny zaadsorbowanej do powierzchni różnych PT. Dlatego obserwowane różnice w chemii zewnętrznych regionów warstwy zaadsorbowanego białka sugerują zmiany w orientacji molekuł (podobnie jak w przypadku IgG). Aby zweryfikować tę hipotezę, przeprowadzono analizę struktury molekuly streptawidyny.



Rysunek 6-H9. Wyniki analizy PCA danych z widm ToF-SIMS zarejestrowanych dla streptawidyny zaadsorbowanej do warstw różnych PT. (a) Wartości współrzędnych (Scores) na PC2 obserwacji pomiarowych dla warstw P3BT (kwadraty), RP3HT (trójkąty) i PQT12 (koła) i (b) wykres współczynników (Loadings) wiążący drugi składnik główny PC2 z sygnałami masowymi ToF-SIMS.

Molekuła streptawidyny jest homotetramerem posiadającym cztery miejsca wiążące biotynę, po jednym na każdą podjednostkę. Każdy monomer ma w swojej budowie sześć reszt tryptofanu (Rys. 7-H9) z czego cztery spośród nich (Trp-79, Trp-92, Trp-108 i Trp-120) biorą udział w oddziaływaniu hydrofobowym z cząsteczką biotyny w miejscu wiążącym. Cho i in. wykazali, że obecność sygnałów od tryptofanu w widmie masowym ToF-SIMS (zebrany dla warstwy streptawidyny osadzonej na podłożu), wskazuje na ekspozycję miejsca wiążącego biotynę na zewnątrz warstwy (co zostało również potwierdzone efektywniejszym wiązaniem biotynyłowanych przeciwciał).³¹

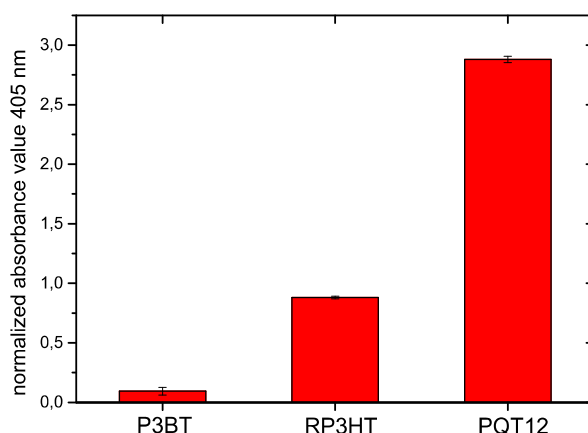
Dodatkowo, każda podjednostka streptawidyny ma w swojej budowie tylko dwie reszty histydyny (His-87 i His-127) (Rys. 7-H9). His-127 bierze udział w oddziaływaniu pomiędzy podjednostką 1 i 3 (jak również 2 i 4) a His-87 znajduje się w pętli L5,6 będącej powyżej miejsca wiążącego biotynę.⁴¹ Ponieważ His-127 jest ukryta głęboko wewnątrz molekuly jej wkład do widma masowego w statycznym modzie ToF-SIMS jest zaniedbywalny. Jednakże, w przypadku modyfikacji struktury czwartorzędowej streptawidyny His-127 może być również eksponowana do wiązki jonów pierwotnych i dawać wkład do widma masowego. Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje można stwierdzić, że większe natężenie sygnałów charakterystycznych dla histydyny w widmie masowym streptawidyny zaadsorbowanej do powierzchni PQT12 potwierdza ekspozycję miejsc wiążących biotynę na zewnątrz i zarazem może sugerować zmiany w strukturze czwartorzędowej streptawidyny.



Rysunek 7-H9. Struktura podjednostki streptawidyny (kod PDB: 1STP) z zaznaczonym niebieską strzałką wektorem momentu dipolowego (241.7 D). Dodatkowo zaznaczono położenie reszt tryptofanu (czerwony) i histydyny (żółty) oraz molekułę biotyny (niebieski).

Kolejnym ważnym aspektem badań były rezultaty prezentujące informacje o oddziaływaniu białko-powierzchnia. Każda podjednostka streptawidyny ma moment dipolowy równy 241.7 D, który jest skierowany od L3,4 do L5,6 (Rys. 7-H9). Jednakże, streptawidyna jest homotetramerem i momenty dipolowe od kolejnych podjednostek znoszą się, tak że moment dipolowy całej molekuly wynosi zero. Dlatego oddziaływanie pomiędzy momentem dipolowym białka a PT nie może być siłą napędową adsorpcji. Jednakże, oddziaływanie pomiędzy momentem dipolowym podjednostek streptawidyny a warstwą PT mogło zmienić orientację lub nawet nieznacznie strukturę czwartorzędową całej molekuly, tak aby miejsca wiążące biotynę zostały wyeksponowane w zewnętrznych rejonach warstwy białka. Wniosek ten jest zgodny z wcześniejszymi obserwacjami dla IgG zaprezentowanymi w [H5], jak również z wynikami zaprezentowanymi przez E. Macchia i in.⁴². Badania grupy z Bari wskazują, że symetryczna struktura tetramerycznych białek wiążących biotynę zmienia się po adsorpcji do RP3HT (półprzewodnika organicznego).⁴² Ponadto, podjednostki białka znajdujące się bliżej warstwy PT będą znacznie silniej oddziaływać z organicznym półprzewodnikiem niż te znajdujące się dalej od powierzchni międzyfazowej.⁴²

Analiza PCA danych ToF-SIMS wraz z analizą struktury streptawidyny ujawniła, że streptawidyna zaadsorbowana do cienkich warstwach PQT12 przyjmuje taką orientację, że miejsca wiążące biotynę są eksponowane na powierzchni, co wskazuje na najwyższą aktywność biologiczną zaadsorbowanego białka w porównaniu do dwóch pozostałych podłoży. Obserwacja ta została również potwierdzona przy użyciu testu immunoenzymatycznego (Rys. 8-H9). Wyniki ELISA ujawniły trzykrotnie wyższe wiązanie koniugatu biotyna-HRP ze streptawidyną zaadsorbowaną na powierzchni PQT12 w porównaniu do RP3HT. Co więcej streptawidyna zaadsorbowana do warstw P3BT straciła prawie całkowicie swoją aktywność biologiczną.



Rysunek 8-H9. Absorbancja fali o długości 405 nm otrzymana dla roztworu, w którym inkubowano powierzchnie różnych polimerów PT z zaadsorbowaną streptawidyną po reakcji z biotynylnym HRP. Znormalizowana wartość absorbancji odpowiada ilości związanego koniugatu biotyna-HRP (słupki reprezentują średnie wartości wraz z niepewnościami (odchylenie standardowe), $n=4$).

Podsumowanie wyników badań zaprezentowanych w pracach [H1, H5 i H9]

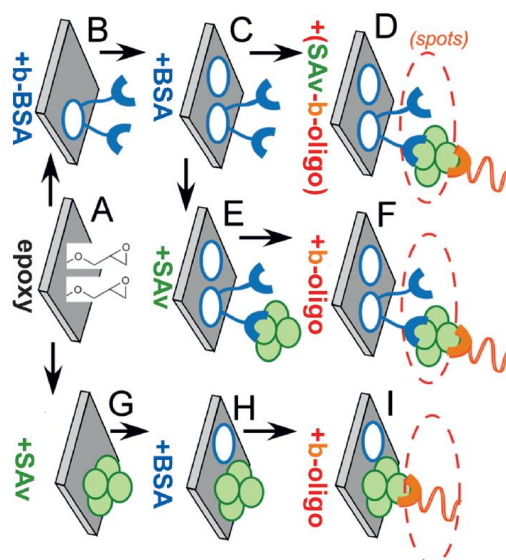
Przeprowadzone badania nad adsorpcją białek do powierzchni cienkich warstw polimerów sprzężonych wykazały wpływ krystalizacji molekuł polimeru w warstwie na orientację i konformację zaadsorbowanych białek. Odkrycie to, w połączeniu z faktem zwiększonej ruchliwości ładunków w cienkich semikrystalicznych warstwach PT, wspiera zastosowanie tych podłoży do konstrukcji urządzeń bioelektronicznych i biosensorycznych. Ponadto przedstawione wyniki pokazują, że PQT12 może być interesującą alternatywą dla RP3HT powszechnie stosowanego w biosensorach opartych na OFET. Kolejnym ważnym rezultatem było odkrycie, że oddziaływanie między momentem dipolowym białka a warstwą polimerową odgrywa znaczącą rolę w orientacji jego molekuł. Odkrycie to sugeruje, że moment dipolowy całej cząsteczki białka lub jego podjednostek może oddziaływać z warstwą PT i orientować białko lub nawet zmieniać nieznacznie jego strukturę czwartorzędową bez naruszenia aktywności biologicznej.

Co więcej, w badaniach tych zaproponowano i zastosowano kilka nowych rozszerzeń metod analizy powierzchni. Po pierwsze, ekspozycja do powierzchni bocznych łańcuchów alkilowych molekuł PT będąca wynikiem struktury semikrystalicznej o orientacji krystalitów „edge-on” została wykryta za pomocą analizy PCA danychToF-SIMS. Po drugie, zaproponowano bardziej rygorystyczne podejście do badania zmian konformacyjnych białka na podstawie danychToF-SIMS, poprzez porównanie ładunków (Loadings) z analizy PCA przeprowadzonej dla różnych aminokwasów z hydrofobowością ich łańcucha bocznego, zamiast powszechnie stosowanej uproszczonej klasyfikacji tylko jako hydrofobowe lub hydrofilowe.

Badania przeprowadzono w ramach projektu finansowanego przez NCN (PRELUDIUM) UMO-2011/03/N/ST5/04764, którego byłem kierownikiem.

III. Weryfikacja nowych protokołów tworzenia mikromacierzy DNA [H2 i H4]

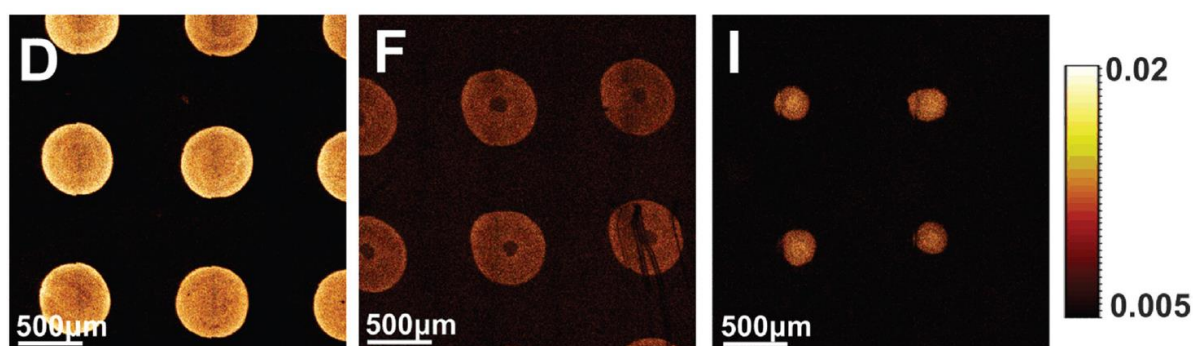
Układ biotyna-streptawidyna został również użyty w trakcie badań nad protokołami pozwalającymi unieruchomić biotynylowane sondy oligonukleotydowe na powierzchniach zmodyfikowanych silanami. Mikromacierze i sensory DNA znalazły szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach, takich jak badania genetyczne, diagnostyka chorób zakaźnych, monitorowanie środowiska oraz jakość i bezpieczeństwo żywności.⁴³⁻⁴⁵ Niezależnie od zastosowania, wydajność tych urządzeń silnie zależy od sposobu unieruchomienia na powierzchni jednoniciowych DNA służących jako sondy detekcyjne. Dobór metody immobilizacji wpływa nie tylko na gęstość sond na powierzchni, ale również ich stabilność i orientację. W ramach przeprowadzonych badań zweryfikowano trzy wielokrokowe protokoły wykorzystujące wiele molekuł w tym układ biotyna-streptawidyna do wytworzenia mikromacierzy DNA (przy użyciu mikrodruku kontaktowego) na podłożu SiO₂ zmodyfikowanym silanem (zawierającym grupy epoksydowe) (Rys. 9-H2). W ramach prac przeprowadzono charakterystykę powierzchni przy użyciu AFM, ToF-SIM i XPS po każdym kroku depozycji/reakcji kolejnych molekuł. Kolejne protokoły przygotowania macierzy obejmowały: drukowanie koniugatu streptawidyny z biotynylowanym łańcuchem oligonukleotydów (SAv-b-oligo) na podłożu pokrytym wcześniej biotynylowanym BSA (protokół I: A–B–C–D, Rys. 9-H2); drukowanie biotynylowanych oligonukleotydów (b-oligo), na podłożu pokrytym streptawidyną w wyniku wcześniejszej reakcji z biotynylowanym BSA (protokół II: A–B–C– E–F, Rys. 9-H2), lub bezpośrednio osadzonej na silanizowanym podłożu (protokół III: A–G–H–I, Rys. 9-H2). Rezultaty przeprowadzonych badań zostały opisane w pracach [H2 i H4].



Rysunek 9-H2. Schemat trzech różnych protokołów immobilizacji sond oligonukleotydowych na powierzchni SiO₂ modyfikowanej silanem z grupami epoksydowymi (A) z wykorzystaniem układu biotyna-streptawidyna: I (A–B–C–D), II (A–B–C– E–F) i III (A–G–H–I). Pierwszy sposób I obejmuje immobilizację biotynylowanego BSA (B), blokowanie wolnych miejsc przy użyciu BSA (C),

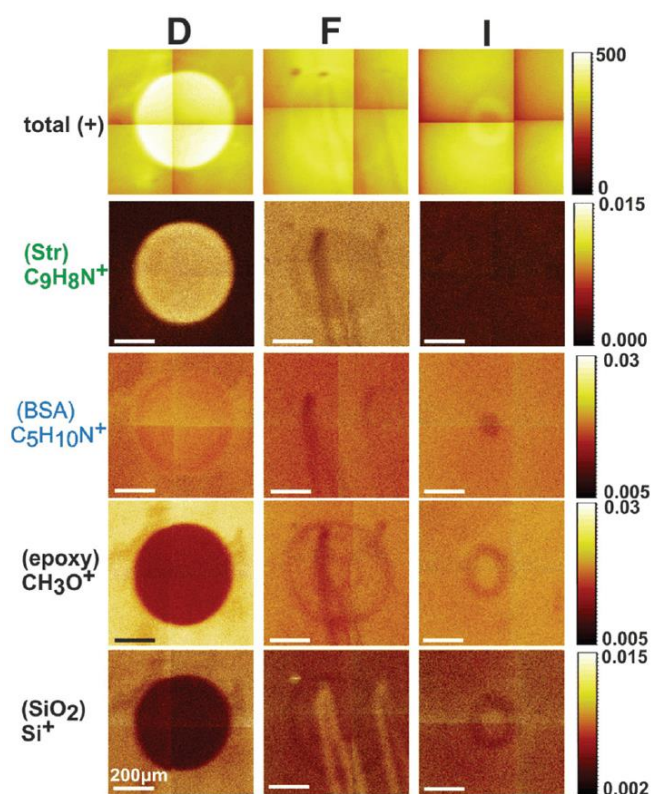
drukowanie kropek z koniugatu streptawidyny z biotynylowanym łańcuchem oligonukleotydów (D). Alternatywnie w protokole II kropki macierzy zostały wydrukowane z biotynylowanych oligonukleotydów (F) na warstwie streptawidyny (E) osadzonej wcześniej dzięki reakcji specyficznej ze związanym kowalencyjnie na powierzchni biotynylowanym BSA (C). Ostatni protokół składał się z immobilizacji streptawidyny na silanizowanej powierzchni SiO_2 (G), blokowaniu wolnych miejsc przy użyciu BSA (H) i drukowaniu kropek z biotynylowanych sond oligonukleotydowych (I).

Istotną kwestią przeprowadzonych badań było uzyskanie powtarzalności charakterystycznych cech we wszystkich kropkach macierzy. Różnice w rozkładzie molekuł pomiędzy kolejnymi punktami mogą utrudniać potencjalne zastosowanie macierzy DNA do oznaczania ilościowego. Aby zbadać ten problem, submilimetrowe domeny macierzy oligonukleotydów przeanalizowano za pomocą obrazowania ToF-SIMS (Rys. 10-H2). Obrazy ToF-SIMS utworzone dla jonów charakterystycznych dla DNA ujawniły dobrą powtarzalność wielkości, kształtu i gęstości DNA dla kropek w macierzach wytworzonych za pomocą każdej z analizowanych metod immobilizacji.



Rysunek 10-H2. Obrazy ToF-SIMS macierzy DNA na powierzchni SiO_2 utworzone na podstawie analizy ujemnie naładowanych jonów wtórnych pochodzących z oligonukleotydów (rozmiar analizowanego obszaru $2.5 \text{ mm} \times 2.5 \text{ mm}$). Analiza obrazów ujawnia powtarzalność wielkości, kształtu, intensywności i specyficznych cech rozkładu oligonukleotydów kropek dla tej samej macierzy.

Ponadto, dzięki wysokiej specyficzności metody ToF-SIMS możliwa jest analiza wielomolekularnego składu powierzchni mikromacierzy, dzięki detekcji sygnałów charakterystycznych dla każdej z molekuł użytych w każdej z procedur przygotowania macierzy (Rys. 11-H2 oraz Rys. 10-H2).



Rysunek 11-H2. Dystrybucja wszystkich molekuł (rzęd oznaczony „total +”) oraz komplementarne obrazy dystrybucji streptawidyny (rzęd oznaczony „Str” odpowiadający intensywności jonu $C_9H_8N^+$ charakterystycznego dla tryptofanu), BSA (odpowiadający intensywności jonu $C_5H_{10}N^+$ charakterystycznego dla lizyny), silanu z grupami epoksydowymi (rzęd oznaczony „epoxy” odpowiadający intensywności jonu CH_3O^+) oraz podłoża SiO_2 (odpowiadający intensywności jonu Si^+) otrzymane dzięki obrazowaniu ToF-SIMS kropek macierzy przygotowanych według wszystkich trzech protokołów (kolumny D, F i I). Obrazy otrzymane dla wszystkich jonów zarejestrowanych przez analizator (rzęd oznaczony „total +”) zostały użyte do normalizacji pozostałych obrazów (pokazanych już po normalizacji).

Tworzenie kropek macierzy, dla każdego z trzech analizowanych protokołów, następowało w różnych warunkach, co miało znaczący wpływ na ostateczny kształt macierzy. W wyniku procedury I obserwuje się jednolite kropki o rozmiarach ok. 550 μm z jaśniejszym pierścieniem na obrzeżach świadczącym o zwiększonej gęstości powierzchniowej sond oligonukleotydowych tzw. efekt pierścienia kawy (coffee-ring effect). Punkty macierzy powstałe w wyniku drugiej procedury mają rozmiar ok. 570 μm i wykazują dwa charakterystyczne pierścienie. Wewnętrzny pierścień wyznacza obszar o zmniejszonej gęstości powierzchniowej oligonukleotydów tworząc tzw. strukturę pączka-oponki (doughnut-like). Wreszcie, kropki powstałe w wyniku procedury III mają kształt piku z maksimum w środku i znacznie mniejszym rozmiarze 270 μm . Końcowy rozmiar wytworzonych kropek jest związany głównie z różnym pokryciem powierzchni białkiem (ujawnionym przez XPS) i chropowatością (ujawnioną przez AFM) – zwiększającymi zwilżalność powierzchni i rozmiar

drukowanych kropli DNA. Dodatkową rolę odgrywa też lepkość roztworu, która zmniejsza wielkość kropli.

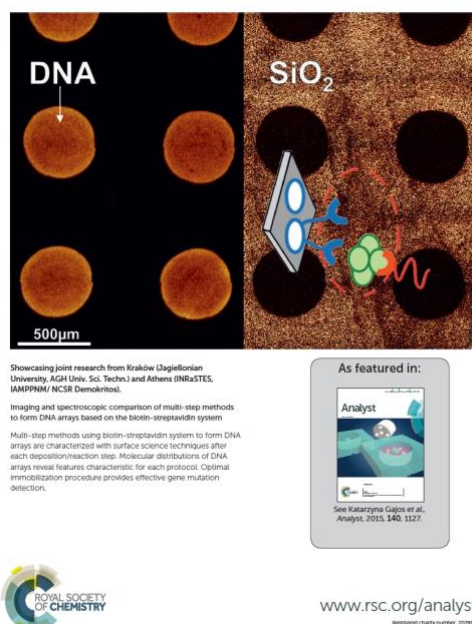
Dodatkowo badania XPS pokazały, że największą i najmniejszą gęstość powierzchniową streptawidyny (od ilości której zależy pośrednio gęstość sond DNA) osiągnięto odpowiednio dla protokołu I i III, co jest zgodne z wynikami mikro-analizy ToF-SIMS.

Ostatni etap badań nad metodami immobilizacji sond oligonukleotydowych skupił się na ocenie zastosowania prezentowanych protokołów do analizy rzeczywistych próbek [H4]. Przygotowane mikromacierze wykorzystano do detekcji mutacji pojedynczych nukleotydów w genie BRCA1 (rak piersi). Mikromacierze wytworzone według protokołu I zapewniają znacznie szybszą kinetykę hybrydyzacji z produktami PCR, zmniejszając do 30 min. czas hybrydyzacji wymagany dla mikromacierzy, który jest znacznie dłuższy dla protokołów III (3 h) i II (1 h). Co więcej protokół I zapewnia również znacznie wyższe sygnały hybrydyzacji w porównaniu z podejściami III i II. Zaletą mikromacierzy przygotowanych zgodnie z protokołem I jest również wysoki współczynnik dyskryminacji (wyższy niż 20) dla wszystkich testowanych mutacji, podczas gdy dla protokołu III był on nie wyższy niż 5.

Podsumowanie wyników badań zaprezentowanych w pracach [H2 i H4]

W ramach przeprowadzonych badań nanostruktura, chemia i pokrycie powierzchni macierzy DNA uzyskanych w wyniku wieloetapowych protokołów, zostały po raz pierwszy scharakteryzowane po każdym etapie osadzania/reakcji biomolekuł. Jednoczesna analiza rozmieszczenia wielu molekuł wewnątrz kropek DNA pozwoliła scharakteryzować wielkość, powtarzalność i morfologię uzyskanych kropek w każdym z trzech weryfikowanych protokołów immobilizacji sond oligonukleotydowych. Badania spektroskopowe i mikroskopowe wykazały, że najwyższą wydajność unieruchomienia oligonukleotydów osiągnięto według nowej strategii, gdy koniugaty streptawidyny z biotynylowanymi oligonukleotydami są drukowane na powierzchniach pokrytych biotynylowaną BSA. Ponadto opracowany protokół immobilizacji oligonukleotydów zapewnia wyższą czułość i współczynnik dyskryminacji przy jednoczesnej redukcji czasu analizy.

Wyniki opublikowane w pracy [H2] zostały wybrane na tylną okładkę czasopisma *Analyst* (Rys. 12-H2). Prezentowane badania zostały przeprowadzone w ramach grantu europejskiego FOODSNIFFER (FP7-ICT8-318319). Próbkę została przygotowana przez dr Panagiotę Petrou z the Institute of Nuclear & Radiological Sciences & Technology, Energy & Safety, NCSR "Demokritos".



Rysunek 12-H2. Tylne okładka czasopisma Analyst (2015) 140 prezentująca wyniki badań nad różnymi protokołami tworzenia mikromacierzy DNA.

IV. Warstwy polimerowe o przełączalnych właściwościach [H7, H8 i H10]

W ostatnich latach podjęto znaczne wysiłki mające na celu opracowanie materiałów polimerowych reagujących na temperaturę.^{46–50} Szczególną uwagę zwrócono na szczotki polimerowe „szczepione” do powierzchni oraz ich podstawowe właściwości i potencjalne zastosowania.^{49,50} Znaczna część tych badań została poświęcona szczotkom polimerowym wykazującym termo-przełączalne właściwości związane z dolną lub górną krytyczną temperaturą rozpuszczania polimeru (LCST lub UCST).^{51–55} Chociaż większość wrażliwych na temperaturę szczotek polimerowych opiera się na LCST lub UCST, istnieją również inne mechanizmy odpowiedzi temperaturowej.^{56–58} Wśród nich najważniejsze są przejścia związane z przejściem ze stanu szklistego w stan elastyczny (T_g - temperatura zeszklenia) lub topnieniem fazy krystalicznej (T_m - temperatura topnienia).⁵⁹ Niestety, efekty przejść związanych z T_g i T_m w szczotkach polimerowych są rzadko wykorzystywane w badaniach biomedycznych, co najprawdopodobniej jest spowodowane wysokimi temperaturami tych przejść.

Kolejnym interesującym zagadnieniem związanym z responsywnymi układami polimerowymi, zwłaszcza szczepionymi szczotkami, jest wprowadzenie nanocząstek metalicznych lub półprzewodnikowych (NP), które otwierają nowe drogi inżynierii materiałów kompozytowych. Materiały te wykazują unikalne właściwości biologiczne, mechaniczne, elektryczne lub optyczne.^{60–63} Szczególną uwagę poświęca się nanocząstkom srebra (Ag-NP) ze względu na ich łatwą syntezę, niską toksyczność i stosunkowo niski koszt produkcji.^{64–66} Ponadto Ag-NP wzbudzają wiele zainteresowania ze względu na ich dobrą przewodność elektryczną, stabilność chemiczną⁶⁶, właściwości

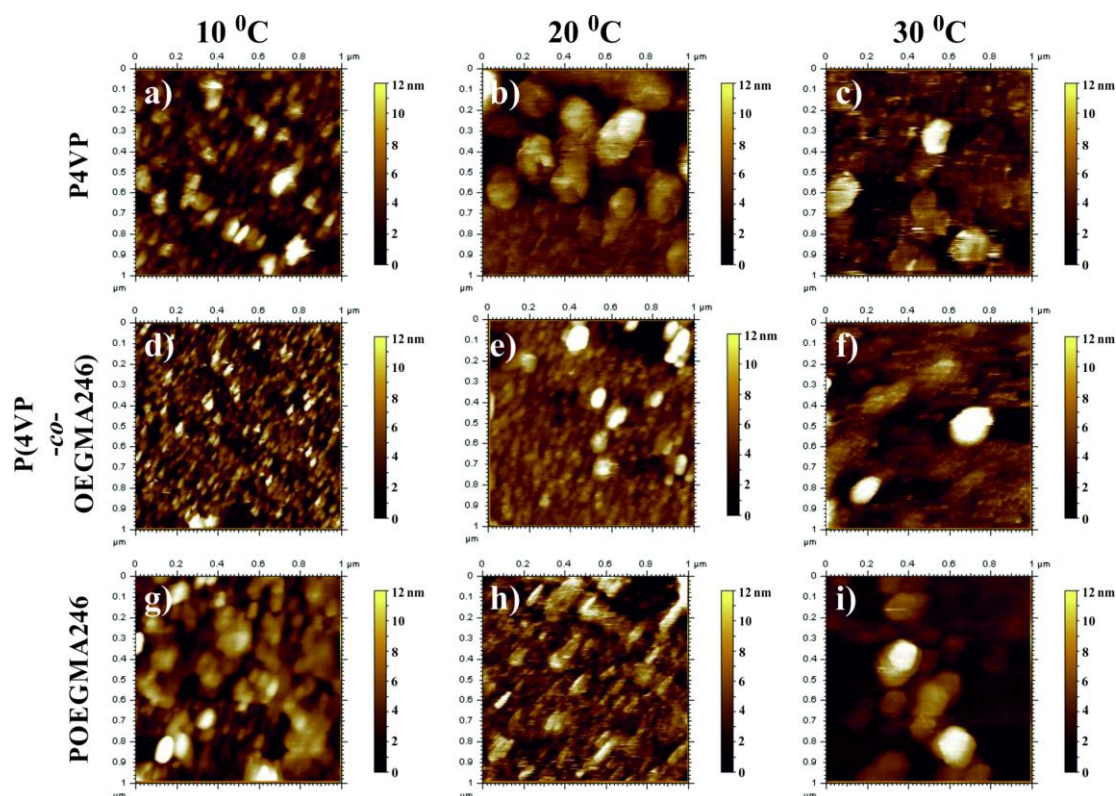
antybakteryjne⁶⁷ oraz właściwości elektryczne i optyczne^{68,69}. Pierwsze próby włączenia Ag-NP do szczepionych szczotek polimerowych z użyciem borowodoru sodu jako środka redukującego zostały opisane w pracach Benetti i in.⁷⁰ oraz Gupta i in.^{71,72}, jednak przedstawione w tych pracach informacje o kształcie wytworzonych nanocząstek są bardzo ograniczone.

W pracy [H7 i H10] przedstawiono badania nad szczepionymi szczotkami poli(metakrylanu n-butylo) (PBMA) o temperaturze zeszklenia zbliżonej do zakresu temperatur fizjologicznych ($T_g = 20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$)^{73,74}. Natomiast praca [H8] przedstawia modyfikację termoprzełączalnych szczotek polimerowych bazujących na LCST poprzez wprowadzenie nanocząstek srebra. We wszystkich przypadkach szczotki polimerowe szczepiono „z powierzchni” szkła zmodyfikowanego warstwą molekuł samoorganizujących (3-aminopropyl)trietoksylsilanu (APTES) stosując polimeryzację rodnikową z przeniesieniem atomu (ATRP) lub inicjator polimeryzacji (oligomer nadtlenny).

Ag-NP zostały wprowadzone do trzech różnych typów szczotek polimerowych [H8]: poli(4-winylopiirydyny) (P4VP), poli(metakrylanu eteru etylowego glikolu oligoetylenowego 246) (POEGMA246) i kopolimeru wyżej wymienionych polimerów (P(4VPco-OEGMA246)). Metoda syntezy szczotek bazowała na czteroetapowej procedurze z użyciem borowodoru sodu jako środka redukującego i została zweryfikowana badaniami ToF-SIMS. Dla wszystkich szczotek z nanocząstkami widma ToF-SIMS ujawniły obecność dwóch pików $^{107}\text{Ag}^+$ i $^{109}\text{Ag}^+$ charakterystycznych dla Ag-NP. Zarejestrowana ilość nanocząsteczek zależy jednak od rodzaju powłoki polimerowej i zmienia się ze stosunkowo niskiego poziomu dla P4VP do znacznie wyższego dla POEGMA246. Również kształt i wielkość wytworzonych nanocząstek, ujawnione za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (ESEM), były różne dla różnych szczotek polimerowych. W przypadku powłok opartych na P4VP obserwowano sferyczne NP o średnicy 20–60 nm, natomiast dla szczotek POEGMA246 nanocząsteczki miały kształt nanodrutów o dwumodalnym rozkładzie wielkości (20 nm $\times$ 60 nm i 7 nm $\times$ 20 nm). Z kolei bardzo małe Ag-NP w kształcie słabo rozgałęzionych dendrytycznych nanostruktur o średniej szerokości kilku nanometrów zaobserwowano w powłokach P(4VP-co-OEGMA246). Dodatkowe pomiary przeprowadzono w środowisku wodnym przy użyciu AFM pracującego w trybie MAC (magnetyczny mod bezkontaktowy) (Rys. 13-H8). Pomiary wykonano w trzech różnych temperaturach (10, 20 i 30 $^{\circ}\text{C}$) dobierając je tak by były poniżej, pomiędzy i powyżej LCST obu polimerów użytych do wytworzenia szczotek (P4VP: $T_c = 14\text{ }^{\circ}\text{C}$; POEGMA246: $T_c = 26\text{ }^{\circ}\text{C}$). Otrzymane obrazy topografii zależą silnie od składu chemicznego szczotki i zgodnie z przewidywaniem obserwowane są znaczne zmiany w topografii powierzchni w odpowiedzi na zmianę temperatury. Najbardziej złożoną transformację topografii powierzchni zaobserwowano dla powłok opartych na kopolimerach, dla których wcześniejsze badania ujawniły podwójne przejście temperaturowe.⁷⁵

Na koniec zbadano właściwości optyczne szczotek polimerowych z Ag-NP za pomocą techniki UV-VIS. Analiza zarejestrowanych widm absorpcyjnych wykazała silną zależność absorpcji plazmonowej od temperatury, zwłaszcza dla szczotek P4VP, dla których zaobserwowano liniową zależność temperaturową.

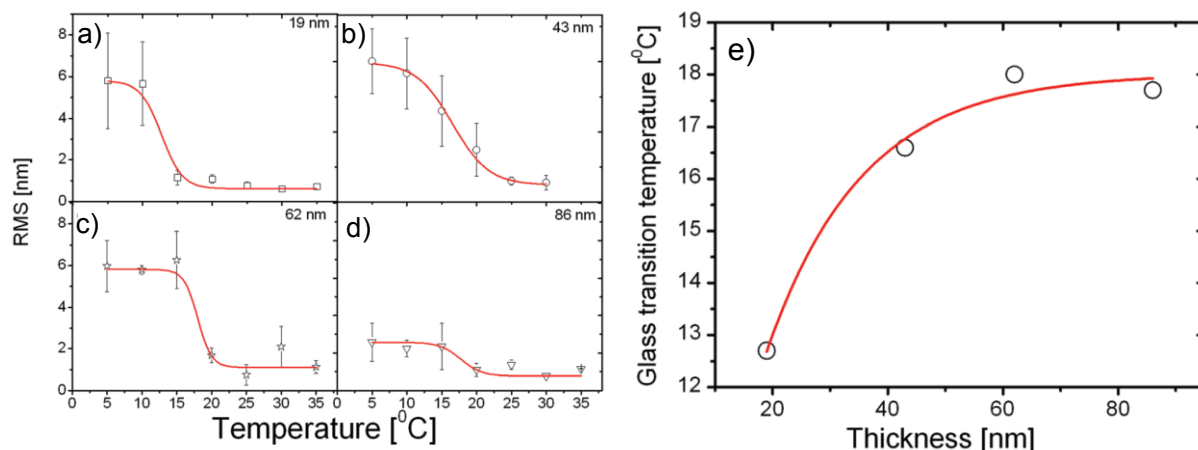
Dodatkowo (nieopublikowane jeszcze) badania będące podstawą polskiego (P.424734) i międzynarodowego (PCT/PL2019/050013) zgłoszenia patentowego ujawniły właściwości bakteriobójcze przełączane temperaturowo szczotek polimerowych z osadzonymi Ag-NP. W temperaturze 4 °C zarówno czyste szczotki polimerowe jak i szczotki z Ag-NP nie wykazują żadnych właściwości bakteriobójczych. Natomiast w temperaturze 37 °C wszystkie typy szczotek polimerowych z nanocząstkami srebra wykazały właściwości bakteriobójcze, podczas gdy wzrost bakterii dla czystych podłoży pozostał bez zmian i był identyczny jak w temperaturze 4 °C.



Rysunek 13-H8. Obrazy AFM przedstawiające topografię podłoży ze szczepionymi szczotkami P4VP (a–c), P(4VP-co-OEGMA246) (d–f) i POEGMA246 (g–i) oraz osadzonymi nanocząstkami srebra. Obrazy zarejestrowano w cieczy w temperaturze 10 °C (a, d oraz g), 20 °C (b, e oraz h) i 30 °C (c, f oraz i).

Ostatnie zagadnienie zaprezentowane w przedłożonym opisie celu naukowego odnosi się do badań właściwości szczepionych szczotek polimerowych PBMA w funkcji temperatury i grubości warstwy [H7]. Właściwości powłok polimerowych zostały scharakteryzowane przy użyciu ToF-SIMS i elipsometrii po każdym etapie ich przygotowania. Pomiary kąta zwilżania wody ujawniły indukowane temperaturą zmiany hydrofobowości powierzchni. Ponadto hydrofobowość szczepionych szczotek PBMA silnie zależy od ich grubości i zmienia się nieliniowo. Co ważniejsze, otrzymane szczotki PBMA wykazały stabilne właściwości termoprzełączalne w ciągu kilku kolejnych cykli grzania i chłodzenia. Chropowatość powierzchni (opisana przez RMS, ang. *root mean square*) oszacowana na podstawie

obrazów AFM szczepionych szczotek PBMA o różnych grubościach i w różnych temperaturach (Rys. 14-H7 a-d)) sugeruje zmianę morfologii warstwy od strukturyzowanej i bardzo szorstkiej do stosunkowo gładkiej w podwyższonej temperaturze dla wszystkich typów badanych szczepionych szczotek PBMA, przy czym zmiany te są najłagodniejsze dla powłoki PMBA o grubości równej 86 nm. Co więcej otrzymane wyniki pokazują, że w przypadku szczotek PBMA o grubości mniejszej niż 60 nm, T_g wzrasta gwałtownie wraz ze wzrostem grubości (Rys. 14-H7 e)).



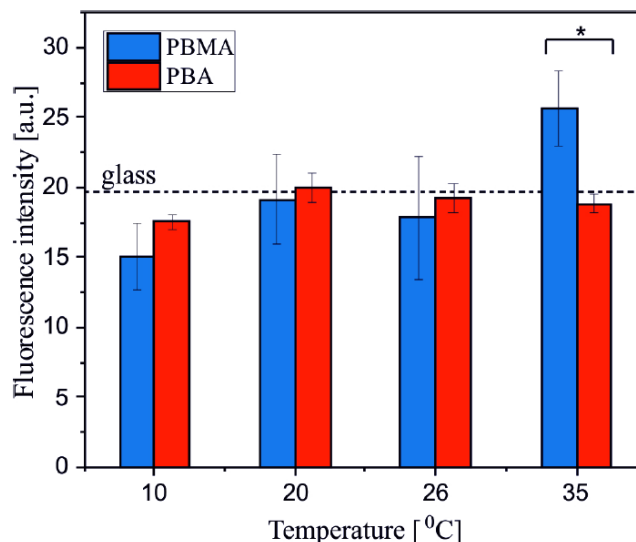
Rysunek 14-H7. (a-d) Zmiana chropowatości powierzchni szczotek PBMA o różnej grubości w funkcji temperatury. (e) Zależności temperatury przejścia T_g od grubości warstwy szczepionej szczotki polimerowej PBMA wyznaczona na podstawie danych AFM (a-d)

Aby zbadać biokompatybilność wytworzonych szczotek PBMA, szczotki o grubości równej 86 nm i 43 nm, jak również płytki szklane (kontrola) użyto jako podłoża do hodowli linii komórkowej HTB-5 raka pęcherza moczowego. Po 144 godzinach hodowli zaobserwowano dobrze rozwiniętą warstwę jednokomórkową na powłoce PBMA o grubości równej 86 nm. Z kolei komórki inkubowane na cieńszej (43 nm) powłoce PBMA, jak również na kontrolnej płytce szkła zaczynały tworzyć warstwę konfluentną.

Wreszcie, w pracy [H10] przedstawiono wpływ temperatury na orientację białek zaadsorbowanych do szczotek PBMA przy użyciu znakowanej fluorescencyjnie BSA i przeciwciała anty-IgG. Jako warstwy odniesienia zastosowano szczepione szczotki poli(akrylanu n-butyłu) (PBA), dla którego temperatura zeszklenia wynosi około -55°C .

W pierwszej kolejności oszacowano ilość molekuł BSA zaadsorbowanych na szczotkach PBMA i PBA w funkcji temperatury na podstawie badań przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej i analizy otrzymanych obrazów za pomocą metody geometrii całkowitej.⁷⁶ Intensywność fluorescencji BSA zaadsorbowanego do szczotek PBA (czerwone słupki na Rysunku 15-H10) jest proporcjonalna do ilości zaadsorbowanego białka i prawie niezależna od temperatury oraz nieco słabsza niż dla kontrolnej próbki czystego szkła (linia przerywana na rysunku 15-H10). Natomiast w przypadku szczotek PBMA, adsorpcja BSA przedstawia silną zależność temperaturową i wzrasta prawie dwukrotnie, dla

temperatury podniesionej z 10 °C (poniżej przejścia) do 35 °C (powyżej przejścia). Gęstość powierzchniowa BSA na referencyjnych próbkach szkła oszacowana z pomiarów XPS wyniosła $0.47 \pm 0.03 \text{ mg/m}^2$.



Rysunek 15-H10. Intensywność fluorescencji molekuł BSA zaadsorbowanych na powłokach PBMA (niebieskie słupki) i PBA (czerwone słupki) oraz na referencyjnych podłożach szklanych (linia przerywana). (* różnice istotne statystycznie, $p < 0,05$).

W następnym kroku zmiany orientacji i konformacji molekuł BSA zaadsorbowanych do szczotek PBMA i PBA zostały zbadane za pomocą ToF-SIMS i PCA. Analizę PCA przeprowadzono na zestawie sygnałów charakterystycznych tylko dla fragmentów aminokwasów, a wyniki analizy BSA na szczotkach PBMA przedstawiono na Rysunku 16-H10. Jak widać na rysunku 16-H10 a), główny składnik PC1 wykazuje największą zmienność (86.39%) w tym zbiorze danych pomiędzy biomolekułą BSA zaadsorowaną na powłokach PBMA i na szkłe stosowanym jako odniesienie. Co więcej, główny składnik PC2 pokazuje różnicę (6.42%) wynikającą z adsorpcji BSA do szczotek PBMA w różnych temperaturach. Punkty pomiarowe zabrane dla powierzchni z BSA adsorbowaną w 10 °C (poniżej przejścia) mają ujemne wartości wyników (Scores) na PC2, podczas gdy próbki inkubowane w temperaturach powyżej przejścia mają takie wartości dodatnie. Ponadto punkty pochodzące od referencyjnego szkła są rozmieszczane losowo wokół wartości zerowej PC2 i nie wykazują zależności temperaturowej. Na podstawie wykresu ładunków (Loadings) na PC2 (Rysunek 16-H10 b)) można zauważyć, że ujemne wartości PC2 są związane wyższą intensywnością fragmentów histydyn, argininy, tyrozyny, seryny i fenyloalaniny. Z kolei dodatnie wartości PC2 wynikają z większych sygnałów (jonów) pochodzących z waliny, lizyny, treoniny, izoleucyny i leucyny. Oznacza to, że regiony BSA bogate w te aminokwasy są eksponowane w zewnętrznych regionach warstwy białka.

W celu sprawdzenia dla molekuly BSA zaadsorbowanej do szczotek PBMA, czy obserwowane i wynikajace ze zmiany temperatury roznicze wartosci wspolrzadnych glownego skladnika PC2 sa zwiazane z denaturacja bialka, zastosowano podejscie przedstawione w pracy [H1]. Wyniki tej analizy (nieprzedstawione tutaj) ujawnily, ze nie mozna wskazac zadnej korelacji laczonej PC2 z indukowanymi temperaturą zmianami konformacji zaadsorbowanych molekul BSA. Dlatego obserwowane roznicze w ekspozycji reszt aminokwasowych na powierzchni warstwy bialka sugeruja zmiany w orientacji BSA. Aby ocenic te hipoteze, przeprowadzono analize struktury BSA.

29

Ponadto seryna występuje najczęściej w Albuminie 2 (12) w porównaniu z Albuminą 1 i Albuminą 3 (7 i 8). Biorąc pod uwagę rezultaty analizy PCA danych ToF-SIMS i analizę struktury BSA można stwierdzić, że BSA zaadsorbowana do szczotek PBMA przyjmuje poniżej T_g taką orientację, że Albumina 1 i Albumina 2 są eksponowane na zewnątrz warstwy, podczas gdy dla temperatur powyżej przejścia to Albumina 3 jest eksponowana.

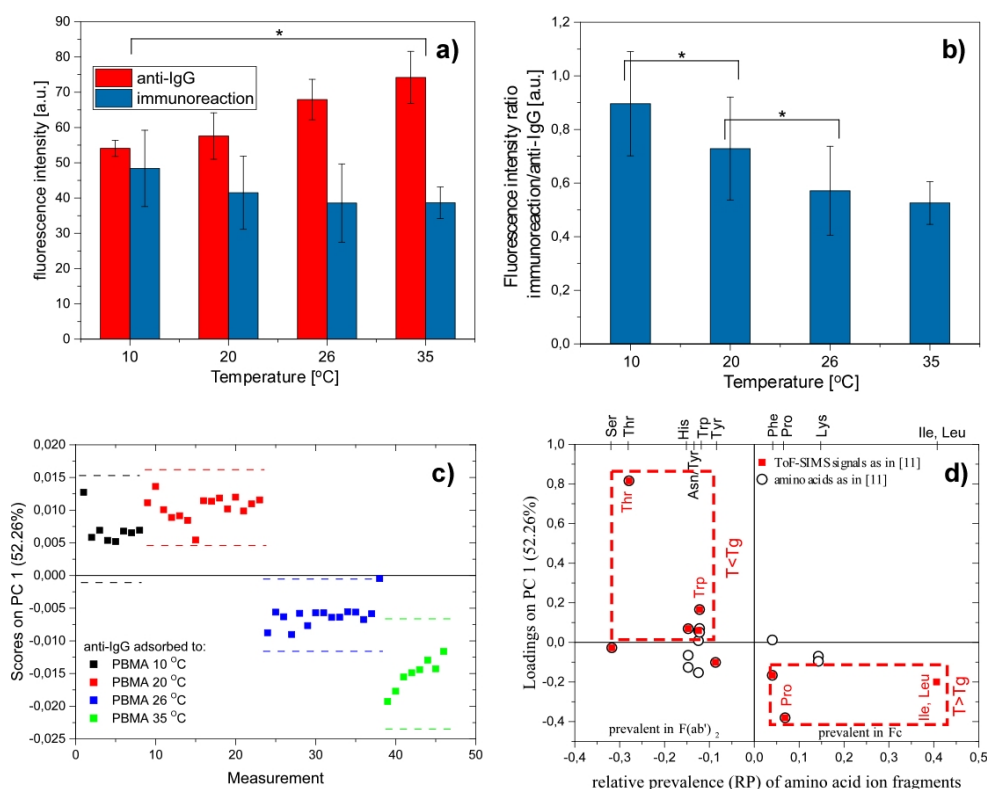
Identyczna analiza danych ToF-SIMS została przeprowadzona dla molekuł BSA zaadsorbowanych do szczotek PBA. Uzyskane rezultaty PCA (nie przedstawione tutaj), tj. wyniki (Scores) i ładunki (Loadings), nie ujawniły żadnych indukowanych temperaturą różnic w adsorpcji białka. Ponownie główny składnik PC1 odzwierciedla największą zmienność (94.24%) w zbiorze danych pomiędzy podłożem PBA a szkłem, do którego została zaadsorbowana BSA. Z kolei drugi główny składnik PC 2, wychwycił tylko 2.01% wariancji i jest wynikiem niewielkich różnic pomiędzy referencyjnymi próbkami szklanymi. Wyniki te są zgodne z danymi uzyskanymi z mikroskopii fluorescencyjnej, w których nie zaobserwowano różnic w ilości białek zaadsorbowanych do szczotek PBA.

Ponieważ badania adsorpcji BSA do szczotek PBMA ujawniły zależną od temperatury orientację zaadsorbowanych molekuł białka, dalsza część badań miała na celu weryfikację tego efektu dla przeciwciał (anty-IgG). Ponownie ilość anty-IgG zaadsorbowanej w różnych temperaturach do powłok PBMA oceniano przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej i analizy obrazów za pomocą metody geometrii całkowitej. Podobnie jak w przypadku BSA, adsorpcja anty-IgG wykazuje silną zależność od temperatury, tak że ze wzrostem temperatury obserwuje się wzrost ilości zaadsorbowanych molekuł (Rys. 17-H10 a), czerwone kolumny).

Następnie przeprowadzono analizę PCA widm ToF-SIMS uzyskanych dla anty-IgG osadzonych w różnych temperaturach na powłokach szczotek PBMA. Główny składnik PC1 (Rys. 17-H10 c)) wyraźnie rozdziela punkty pomiarowe odpowiadające anty-IgG zaadsorbowanej do szczotek PBMA poniżej i powyżej T_g . Dodatkowo wartości wyników (współrzędnych obserwacji) na PC1 odpowiadają molekułom anty-IgG osadzonym w 10 i 20 ° C, podczas gdy anty-IgG adsorbowana w 26 i 35 ° C wykazuje wartości ujemne. Analiza wykresu ładunków na (współczynników wkładu do) PC1 (Rys. 17-H10 d)) ujawnia, że dodatnie wartości na PC1 są związane z wyższą intensywnością sygnałów od treoniny i tryptofanu w widmie masowym. Z kolei ujemne wartości ładunków (Loadings) na PC1 odpowiadają głównie wyższej intensywności fragmentów pochodzących z proliny, izoleucyny i leucyny. Dystrybucja tych aminokwasów w przeciwciele sugeruje jego inną orientację. Aby dokładniej ocenić orientację anty-IgG, zastosowano podejście zaprezentowane w pracy [H5]. Wyniki PCA (ładunki (Loadings) na PC1) porównano z względną częstością występowania (RP) fragmentów aminokwasów (jonów wtórnych) pochodzących z $F(ab')_2$ (ujemne wartości RP) w porównaniu z tymi pochodzącymi z regionu F_c (dodatnie wartości PR). Rysunek 17-H10 d) przedstawia wartości parametru RP^{11} wykreślonego względem otrzymanych ładunków (Loadings) na PC1 określonych w pracy [H10] dla identycznych jonów wtórnych (czerwone kwadraty) i/lub aminokwasów (czarne kółka). Otrzymany

wykres wyraźnie pokazuje, że zewnętrzne regiony anty-IgG zaadsorbowane na powłokach PBMA poniżej T_g (dodatnie wartości PC1) są zdominowane przez fragmenty $F(ab')_2$ molekuly białka (ujemne RP), podczas gdy eksponowany obszar warstwy anty-IgG osadzonej na szczotkach PBMA powyżej T_g (ujemne wartości PC1) odpowiada fragmentom Fc. Przeprowadzona analiza wykazała wpływ temperatury na orientację przeciwciał z dominującą orientacją „head-on” dla molekuł anty-IgG osadzonych powyżej T_g i dominującą orientacją „end-on” dla białka zaadsorbowanego poniżej temperatury przejścia.

Kluczową kwestią, istotną dla wszelkich potencjalnych zastosowań biomedycznych powłok opartych na szczotkach polimerowych z zaadsorbowanymi białkami, zwłaszcza jako biosensorów lub mikromacierzy, jest ich aktywność biologiczna. W celu zbadania, czy proces adsorpcji i zachodzące w różnych temperaturach zmiany wpływają na aktywność biologiczną białka, przeprowadzono badania specyficznej immunoreaktywności antygen-przeciwciała między króliczym anty-IgG specyfikowanym przeciwko kozim przeciwciałom a fluorescencyjnie wyznakowanym kozim IgG (Rys. 17-H10 a), niebieskie słupki). Ponieważ miejsca wiążące antygen zlokalizowane są we fragmentach $F(ab')_2$, wszelkie różnice w intensywności fluorescencji mogą być skorelowane z orientacją zaadsorbowanego anty-IgG. Stosując ponownie analizę obrazów z mikroskopii fluorescencyjnej za pomocą metody geometrii całkowitej oszacowano względną aktywność wiązania specyficznego. Względna aktywność wiązania specyficznego obliczono jako stosunek intensywności fluorescencji zarejestrowanej dla IgG związanych przez anty-IgG zaadsorbowanej do szczotek PBMA w różnych temperaturach (Rys. 17-H10 a), niebieskie słupki) do intensywności fluorescencji zarejestrowanej dla anty-IgG (Rys. 17-H10 a), czerwone słupki). Jak pokazano na Rysunku 17-H10 b), skuteczność wiązania IgG z anty-IgG jest wyższa dla przeciwciała osadzonego w temperaturze poniżej T_g w porównaniu z anty-IgG zaadsorbowanym powyżej temperatury przejścia. Jest to zgodne z wnioskami z analizy PCA danychToF-SIMS (Figura 17-H10 d)), ponieważ w temperaturze poniżej T_g molekuly anty-IgG przyjmują orientację „end-on” w wyniku czego miejsca wiążące są wystawione do roztworu, co umożliwia wiązanie antygenów. Przedstawione wyniki wyraźnie wskazują, że anty-IgG zaadsorbowane do szczotek PBMA zachowuje swoją aktywność biologiczną i potwierdza zmiany orientacji molekuł białka indukowane temperaturą.



Rysunek 17-H10. (a) Intensywność fluorescencji anty-IgG (czerwone słupki) i IgG po związaniu z anty-IgG (immunoreakcja) (niebieskie słupki) zaadsorbowanymi do powłok szczepionych szczotek PBMA. (b) Skuteczność reakcji immunologicznej, obliczonej jako stosunek intensywności fluorescencji zarejestrowanej dla IgG po związaniu z anty-IgG do intensywności fluorescencji zarejestrowanej dla anty-IgG. (*różnice istotne statystycznie, $p < 0,05$). (c) Wykres wyników (Scores) na PC1 analizy PCA danych ToF-SIMS dla anty-IgG zaadsorbowanego do PBMA w temperaturze 10 °C (czarny), 20 °C (czerwony), 26 °C (niebieski) i 35 °C (zielony). Linie przerywane przedstawiają granice ufności na poziomie 95% dla każdej temperatury. (d) Wykres prezentujący ładunki (Loadings) na PC1, wykreślone w funkcji parametru RP jonów od aminokwasów pochodzących z regionów $F(ab')_2$ (ujemne wartości RP) i regionu Fc (dodatnie wartości RP)¹¹. Prostokąty oznaczają schematycznie ekspozycję regionów anty-IgG: $F(ab')_2$ w temperaturze $T < T_g$ i Fc w $T > T_g$, sugerując odpowiednio orientację „end-on” i „head-on”.

Podsumowanie wyników badań zaprezentowanych w pracach [H7, H8 i H10]

Zaprezentowane wyniki badań przedstawiają wpływ chemii powierzchni termoczułych szczepionych szczotek polimerowych (z LCST) na kształt zsyntetyzowanych Ag-NPs. Ponadto pokazano wpływ temperatury na morfologię powłoki i efekty optyczne.

Dalsze badania ujawniły termoprzełączalność (opartą na T_g) powłok PBMA, jak również pokazały duży wpływ temperatury i grubości szczotek PBMA na zwilżalność i morfologię wytworzonych powierzchni. Ponadto wykazano zgodność biologiczną szczotek PBMA poprzez

hodowlę linii komórkowej HTB-5 (komórek rakowych pęcherza moczowego) i wykonanie testu immunologicznego z wykorzystaniem koziego IgG oraz zaabsorbowanego wcześniej do powierzchni króliczego przeciwciała anti-IgG specyfikowanego przeciwko koziemu IgG. Ten ostatni eksperyment potwierdził również różną temperaturowo zależną orientację białka zaadsorbowanego do szczotek PBMA ujawnioną przez PCA danych ToF-SIMS. Analiza ładunku zgromadzonego na molekuły białka jak również zmiany energii powierzchniowej ujawniła, że to topografia powierzchni i elastyczność warstwy polimerowej są odpowiedzialne za zmiany orientacji białek adsorbowanych do powłoki PBMA w różnych temperaturach.

Badania zaprezentowane w pracach [H7 i H10] były częściowo dofinansowane z środków projektu finansowanego przez NCN (SONATA) UMO-2016/21/D/ST5/01633 i grantu z środków własnych Uniwersytetu Jagiellońskiego, których byłem kierownikiem. Badania, których wynikiem jest praca [H8] były finansowane przez Centrum Transferu Technologii CITTRU UJ w ramach projektu "Inkubator Innowacyjności+" w ramach przedsięwzięcia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Inkubator innowacyjności Plus”, na podstawie umowy nr MNISW/2017/DIR/70 z dnia 17.03.2017. Synteza szczotek polimerowych prowadzona była przez dr Jurija Stetsyshyna z Politechniki Lwowskiej.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Na mój pozostały dorobek naukowo badawczy składa się trzydzieści jeden artykułów opublikowanych w czasopiśmie znajdujących się na liście JCR i dwa spoza listy (w sumie 33 prace poza cyklem). Artykuły [P1-P10] zostały opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora, zaś artykuły [D11-D33] zostały opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora. Z tego zbioru, cztery artykuły [P3, P8, P9 i P14] zawierają wyniki wcześniej opisane w pracy doktorskiej.

Oprócz tego jestem współautorem jednego patentu i 8 zagranicznych zgłoszeń patentowych wymienionych poniżej po liście publikacji poza cyklem habilitacyjnym.

Publikacje poza cyklem habilitacyjnym

- P.1 Budkowski, A., Bernasik, A., Moons, E., Lekka, M., Zemła, J., Jaczewska, J., Haberko, J., Raczkowska, J., Rysz, J., Awsiuk, K. (2009) Structures in multicomponent polymer films: Their formation, observation and applications in electronics and biotechnology, *Acta Physica Polonica A*, 115 (2), pp. 435-440.
- P.2 Awsiuk, K., Bernasik, A., Kitsara, M., Budkowski, A., Rysz, J., Haberko, J., Petrou, P., Beltsios, K., Raczkowska, J. (2010) Protein coverage on silicon surfaces modified with amino-organic films: A study by AFM and angle-resolved XPS, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 80 (1), pp. 63-71.

- P.3 Awsiuk, K., Psarouli, A., Petrou, P., Budkowski, A., Kakabakos, S., Bernasik, A., Rysz, J., Raptis, I. (2011) Spectroscopic and microscopic examination of protein adsorption and blocking of non-specific binding to silicon surfaces modified with APTES and GOPS, *Procedia Engineering*, 25, pp. 334-337.
- P.4 Awsiuk, K., Bernasik, A., Kitsara, M., Budkowski, A., Petrou, P., Kakabakos, S., Prauzner-Bechcicki, S., Rysz, J., Raptis, I. (2012) Spectroscopic and microscopic characterization of biosensor surfaces with protein/amino-organosilane/silicon structure, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90 (1), pp. 159-168.
- P.5 Zemła, J., Rysz, J., Budkowski, A., Awsiuk, K. (2012) Proteins grouped into a variety of regular micro-patterns by substrate-guided domains of self-assembling poly(ethylene oxide)/polystyrene blends, *Soft Matter*, 8 (20), pp. 5550-5560.
- P.6 Budkowski, A., Zemła, J., Moons, E., Awsiuk, K., Rysz, J., Bernasik, A., Björström-Svanström, C.M., Lekka, M., Jaczewska, J. (2012) Polymer blends spin-cast into films with complementary elements for electronics and biotechnology, *Journal of Applied Polymer Science*, 125 (6), pp. 4275-4284.
- P.7 Stetsyshyn, Y., Zemla, J., Zolobko, T., Fornal, K., Budkowski, A., Kostruba, A., Donchak, V., Harhay, K., Awsiuk, K., Rysz, J., Bernasik, A., Voronov, S. (2012) Temperature and pH dual-responsive coatings of oligoperoxide-graft-poly(N-isopropylacrylamide): Wettability, morphology, and protein adsorption, *Journal of Colloid and Interface Science*, 387 (1), pp. 95-105.
- P.8 Awsiuk, K., Budkowski, A., Petrou, P., Bernasik, A., Marzec, M.M., Kakabakos, S., Rysz, J., Raptis, I. (2013) Model immunoassay on silicon surfaces: Vertical and lateral nanostructure vs. protein coverage, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, pp. 253-260.
- P.9 Awsiuk, K., Budkowski, A., Psarouli, A., Petrou, P., Bernasik, A., Kakabakos, S., Rysz, J., Raptis, I. (2013) Protein adsorption and covalent bonding to silicon nitride surfaces modified with organosilanes: Comparison using AFM, angle-resolved XPS and multivariate ToF-SIMS analysis, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 110, pp. 217-224.
- P.10 Marzec, M.M., Awsiuk, K., Bernasik, A., Rysz, J., Haberko, J., Łuzny, W., Budkowski, A. (2013) Buried polymer/metal interfaces examined with Kelvin Probe Force Microscopy, *Thin Solid Films*, 531, pp. 271-276.
- P.11 Malainou, A., Tsougeni, K., Ellinas, K., Petrou, P.S., Constantoudis, V., Sarantopoulou, E., Awsiuk, K., Bernasik, A., Budkowski, A., Markou, A., Panagiotopoulos, I., Kakabakos, S.E., Gogolides, E., Tserepi, A. (2013) Plasma-assisted nanoscale protein patterning on si substrates via colloidal lithography, *Journal of Physical Chemistry A*, 117 (50), pp. 13743-13751.
- P.12 Stetsyshyn, Y., Fornal, K., Raczowska, J., Zemla, J., Kostruba, A., Ohar, H., Ohar, M., Donchak, V., Harhay, K., Awsiuk, K., Rysz, J., Bernasik, A., Budkowski, A. (2013) Temperature and pH dual-responsive POEGMA-based coatings for protein adsorption, *Journal of Colloid and Interface Science*, 411, pp. 247-256.

- P.13 Raczkowska, J., Ohar, M., Stetsyshyn, Y., Zemła, J., Awsiuk, K., Rysz, J., Fornal, K., Bernasik, A., Ohar, H., Fedorova, S., Shtapenko, O., Polovkovych, S., Novikov, V., Budkowski, A. (2014) Temperature-responsive peptide-mimetic coating based on poly(N-methacryloyl-L-leucine): Properties, protein adsorption and cell growth, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 118, pp. 270-279.
- P.14 Awsiuk, K., Rysz, J., Petrou, P., Budkowski, A., Bernasik, A., Kakabakos, S., Marzec, M.M., Raptis, I. (2014) Immobilization of oligonucleotide probes on silicon surfaces using biotin-streptavidin system examined with microscopic and spectroscopic techniques, *Applied Surface Science*, 290, pp. 199-206.
- P.15 Stetsyshyn, Y., Raczkowska, J., Budkowski, A., Kostruba, A., Harhay, K., Ohar, H., Awsiuk, K., Bernasik, A., Ripak, N., Zemła, J. (2015) Synthesis and Postpolymerization Modification of Thermoresponsive Coatings Based on Pentaerythritol Monomethacrylate: Surface Analysis, Wettability, and Protein Adsorption, *Langmuir*, 31 (35), pp. 9675-9683.
- P.16 Gostek, J., Awsiuk, K., Pabijan, J., Rysz, J., Budkowski, A., Lekka, M. (2015) Differentiation between Single Bladder Cancer Cells Using Principal Component Analysis of Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 87 (6), pp. 3195-3201.
- P.17 Prauzner-Bechcicki, S., Raczkowska, J., Madej, E., Pabijan, J., Lukes, J., Sepitka, J., Rysz, J., Awsiuk, K., Bernasik, A., Budkowski, A., Lekka, M. (2015) PDMS substrate stiffness affects the morphology and growth profiles of cancerous prostate and melanoma cells, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 41, pp. 13-22.
- P.18 Raczkowska, J., Prauzner-Bechcicki, S., Lukes, J., Sepitka, J., Bernasik, A., Awsiuk, K., Paluszkievicz, C., Pabijan, J., Lekka, M., Budkowski, A. (2016) Physico-chemical properties of PDMS surfaces suitable as substrates for cell cultures, *Applied Surface Science*, 389, pp. 247-254.
- P.19 Bobrowska, J., Moffat, J., Awsiuk, K., Pabijan, J., Rysz, J., Budkowski, A., Reading, M., Lekka, M. (2016) Comparing surface properties of melanoma cells using time of flight secondary ions mass spectrometry, *Analyst*, 141 (22), pp. 6217-6225.
- P.20 Gajos, K., Angelopoulou, M., Petrou, P., Awsiuk, K., Kakabakos, S., Haasnoot, W., Bernasik, A., Rysz, J., Marzec, M.M., Misiakos, K., Raptis, I., Budkowski, A. (2016) Imaging and chemical surface analysis of biomolecular functionalization of monolithically integrated on silicon Mach-Zehnder interferometric immunosensors, *Applied Surface Science*, 385, pp. 529-542.
- P.21 Stetsyshyn, Y., Raczkowska, J., Budkowski, A., Awsiuk, K., Kostruba, A., Nastyshyn, S., Harhay, K., Lychkovskyy, E., Ohar, H., Nastishin, Y. (2016) Cholesterol-Based Grafted Polymer Brushes as Alignment Coating with Temperature-Tuned Anchoring for Nematic Liquid Crystals, *Langmuir*, 32 (42), pp. 11029-11038.
- P.22 Gosecka, M., Raczkowska, J., Haberko, J., Awsiuk, K., Rysz, J., Budkowski, A., Marzec, M.M., Bernasik, A., Basinska, T. (2016) Multilayers of poly(styrene/ α -tert-butoxy- ω -vinylbenzyl-

- polyglycidol) microspheres with core-shell morphology: Characterization by AFM, SIMS and XPS, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 507, pp. 200-209.
- P.23 Bobrowska, J., Pabijan, J., Wiltowska-Zuber, J., Jany, B.R., Krok, F., Awsiuk, K., Rysz, J., Budkowski, A., Lekka, M. (2016) Protocol of single cells preparation for time of flight secondary ion mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*, 511, pp. 52-60.
- P.24 Raczkowska, J., Stetsyshyn, Y., Awsiuk, K., Zemła, J., Kostruba, A., Harhay, K., Marzec, M., Bernasik, A., Lishchynskyi, O., Ohar, H., Budkowski, A. (2016) Temperature-responsive properties of poly(4-vinylpyridine) coatings: Influence of temperature on the wettability, morphology, and protein adsorption, *RSC Advances*, 6 (90), pp. 87469-87477.
- P.25 Bobrowska, J., Pabijan, J., Wiltowska-Zuber, J., Jany, B.R., Krok, F., Awsiuk, K., Rysz, J., Budkowski, A., Lekka, M. (2016) Data on step-by-step atomic force microscopy monitoring of changes occurring in single melanoma cells undergoing ToF SIMS specialized sample preparation protocol, *Data in Brief*, 8, pp. 1322-1332.
- P.26 Raczkowska, J., Awsiuk, K., Prauzner-Bechcicki, S., Pabijan, J., Zemła, J., Budkowski, A., Lekka, M. (2017) Patterning of cancerous cells driven by a combined modification of mechanical and chemical properties of the substrate, *European Polymer Journal*, 93, pp. 726-732.
- P.27 Gajos, K., Budkowski, A., Tsiaila, Z., Petrou, P., Awsiuk, K., Dąbczyński, P., Bernasik, A., Rysz, J., Misiakos, K., Raptis, I., Kakabakos, S. (2017) Contact pin-printing of albumin-fungicide conjugate for silicon nitride-based sensors biofunctionalization: Multi-technique surface analysis for optimum immunoassay performance, *Applied Surface Science*, 410, pp. 79-86.
- P.28 Raczkowska, J., Stetsyshyn, Y., Awsiuk, K., Lekka, M., Marzec, M., Harhay, K., Ohar, H., Ostapiv, D., Sharan, M., Yaremchuk, I., Bodnar, Y., Budkowski, A. (2017) Temperature-responsive grafted polymer brushes obtained from renewable sources with potential application as substrates for tissue engineering, *Applied Surface Science*, 407, pp. 546-554.
- P.29 Gajos, K., Budkowski, A., Pagkali, V., Petrou, P., Biernat, M., Awsiuk, K., Rysz, J., Bernasik, A., Misiakos, K., Raptis, I., Kakabakos, S. (2017) Indirect immunoassay on functionalized silicon surface: Molecular arrangement, composition and orientation examined step-by-step with multi-technique and multivariate analysis, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 150, pp. 437-444.
- P.30 Gajos, K., Kamińska, A., Awsiuk, K., Bajor, A., Gruszczyński, K., Pawlak, A., Żądło, A., Kowalik, A., Budkowski, A., Stępień, E. (2017) Immobilization and detection of platelet-derived extracellular vesicles on functionalized silicon substrate: cytometric and spectrometric approach, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409 (4), pp. 1109-1119.
- P.31 Marzec, M.M., Awsiuk, K., Dąbczyński, P., Rysz, J., Budkowski, A., Bernasik, A. (2018) Influence of Acrylic Polymers Stereoregularity on Interface Interactions in Model Thin Film Systems, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 219 (15), art. no. 1800097,
- P.32 Gajos, K., Budkowski, A., Petrou, P., Pagkali, V., Awsiuk, K., Rysz, J., Bernasik, A., Misiakos, K., Raptis, I., Kakabakos, S. (2018) Protein adsorption/desorption and antibody binding

stoichiometry on silicon interferometric biosensors examined with TOF-SIMS, Applied Surface Science, 444, pp. 187-196.

P.33 Zemła, J., Gajos, K., Awsiuk, K., Rysz, J., Budkowski, A. (2019) Sequential binary protein patterning on surface domains of thermo-responsive polymer blends cast by horizontal-dipping, Materials Science and Engineering C, 99, pp. 1477-1484.

Patenty i zgłoszenia patentowe:

Patenty:

1. P.418951, Kamil Awsiuk, Jakub Rysz, Mateusz Marzec, Andrzej Budkowski, 2016-10-01, Urządzenie i sposób wytwarzania warstw polimerowych o zadanej strukturze przestrzennej

Międzynarodowa faza zgłoszenia patentowego PCT:

1. PCT/PL2017/050048, Kamil Awsiuk, Jakub Rysz, Mateusz Marzec, Andrzej Budkowski, 2017-09-25, A device and a method for preparation of polymer films having a predefined spatial structure
2. PCT/PL2019/050013, Andrzej Budkowski, Joanna Raczkowska, Kamil Awsiuk, Yuriy Stetsyshyn, 2019-03-02, Polymer material with thermal-switching bactericidal properties, the method of its preparation and application
3. PCT/EP2019/055935, Kamil Awsiuk, Paweł Dąbczyński, Maciej Michalik, Jakub Rysz, Mateusz Marzec, 2019-03-09, Conducting a reaction in a meniscus moved over a substrate
4. PCT/EP2018/083248, Kamil Awsiuk, Paweł Dąbczyński, Jakub Rysz, Maciej Michalik, Mateusz Marzec, 2018-12-02, Conducting a photochemical reaction in a moving meniscus
5. PCT/EP2019/056361, Jakub Rysz, Paweł Dąbczyński, Mateusz Marzec, Kamil Awsiuk, 2019-03-13, Producing nanoporous films of semiconducting metal oxides

Zgłoszenia patentowe fazy krajowe:

1. A device and a method for preparation of polymer films having a predefined spatial structure:
 - EPO, EP17798003.4, Data wejścia w fazę EP: 7 kwietnia 2019r.
 - USA, US 16/338,481, Data wejścia w fazę US: 31 marca 2019r.
 - Australia, AU2017337999, Data wejścia w fazę AU: 7 marca 2019r.
 - Indie, IN201917012750, Data wejścia w fazę IN: 29 marca 2019r.

Polskie zgłoszenia patentowe:

1. P.423691, Kamil Awsiuk, Paweł Dąbczyński, Maciej Michalik, Jakub Rysz, Mateusz Marzec, 2017-12-04, Urządzenie i sposób prowadzenia reakcji fotochemicznej w przesuwającym menisku

2. P.424734, Andrzej Budkowski, Joanna Raczkowska, Kamil Awsiuk, Yuriy Stetsyshyn, 2018-03-02 Polimerowy materiał o termoprzelącalnej bakteriobójczości, sposób jego otrzymywania i zastosowania
3. P.425045, Jakub Rysz, Kamil Awsiuk, Mateusz Marzec, Paweł Dąbczyński, 2018-03-28, Sposób wytwarzania nanoporowatych warstw półprzewodzących tlenków metali
4. P.425043, Andrzej Budkowski, Jakub Rysz, Kamil Awsiuk, Paweł Dąbczyński, Dariusz Augustowski, 2018-03-28, Sposób wytwarzania warstw aktywnych polimerowych urządzeń optoelektronicznych
5. P.425002, Andrzej Budkowski, Jakub Rysz, Kamil Awsiuk, Mateusz Marzec, Paweł Dąbczyński, Maciej Michalik, 2018-03-23, Urządzenie do oddziaływania na ciecz w menisku przesuwanym po podłożu i sposób prowadzenia reakcji

Okres przed uzyskaniem stopnia doktora

Studia fizyki ukończyłem na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego w 2009 roku obroną pracy magisterskiej p.t. „Badanie własności powierzchni czynnej biosensorów metodami mikroskopii skaningowej i spektroskopii fotoelektronów” przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Budkowskiego. Podczas tych badań opracowałem podejście do określania cech struktury, takich jak stopień pokrycia powierzchni i grubość warstwy powstałej w wyniku adsorpcji białka na podłożach krzemowych (zmodyfikowanych amino-silanami) służącymi jako modelowa powierzchnia biosensora. Warstwę białka zbadano za pomocą kątowo rozdzielczego XPS (ARXPS) i AFM. Otrzymane dane pomiarowe przeanalizowano przy użyciu nowego modelu ARXPS dwuwarstwy organicznej w połączeniu z analizą metodą geometrii całkowitej obrazów AFM topografii warstw z zaadsorbowanym białkiem. Wyniki tych badań opublikowano w pracy [P2].

Badania nad modelowymi powierzchniami biosensorów zainicjowane w trakcie pracy magisterskiej zostały poszerzone podczas studiów doktoranckich (2009-2013). Celem badań prowadzonych w czasie studiów doktoranckich była mikro- i spektroskopowa analiza struktury i właściwości warstw biomolekularnych o grubości kilku nanometrów istotnych dla zastosowań w biosensorach (tytuł pracy doktorskiej: “Biomolecular nanolayers on synthetic organic films: their structure and properties for biosensor applications”). Przygotowanie powierzchni biosensorów to proces wieloetapowy w trakcie którego wykorzystuje się wiele różnych molekuł. Dlatego podczas studiów doktoranckich zaimplementowano różne metody mikroskopowe z skanującym próbnikiem, takie jak mikroskopia sił atomowych, skanująca mikroskopia optyczna bliskiego pola jak również metody spektroskopowe – ToF-SIMS, XPS czy ARXPS w celu analizy procesu przygotowania modelowej powierzchni biosensora. W trakcie badań analizowano układ bazujący na krzemowym przetworniku sfunkcjonalizowanym przy użyciu różnych biomolekuł detekcyjnych w tym białka czy sondy DNA. Główne zagadnienia opisane w rozprawie doktorskiej dotyczyły: a) porównania adsorpcji fizycznej i

wiązania kowalencyjnego IgG do powierzchni zmodyfikowanej silanami zakończonymi odpowiednio grupami aminowymi i epoksydowymi [P9]; b) pełnej charakterystyki warstw białek detekcyjnych po wieloetapowej procedurze przygotowania powierzchni jak i immunoreakcji [P4]; c) modelowego testu immunologicznego na powierzchniach krzemowych – opis nanostruktury powstałej warstwy [P8]; d) weryfikacji czterech protokołów opartych na układzie streptawidyna-biotyna a służących do przestrzennie-jednorodnego osadzenia sond oligonukleotydowych na powierzchni sensora modyfikowanej amino-silanami [P14].

Wyniki badań zaprezentowane zarówno w pracy magisterskiej jak i rozprawie doktorskiej zostały wykorzystane do przygotowania biosensora w ramach projektu europejskiego PYTHIA (2008-2012) “Monolithically integrated interferometric biochips for label-free early deTectiOn of Human dIseAses”. Dodatkowo, praca [P14] była punktem startowym od badań nad osadzaniem sond DNA przestrzennie-ograniczonym do kropek mikromacierzy na podłożu modyfikowanym silanami z grupą epoksydową (Sekcja III. Celu naukowego i uzyskanym wyników [H2, H4]).

W trakcie studiów doktoranckich rozpocząłem współpracę z dr Panagiota Petrou z the Institute of Nuclear & Radiological Sciences & Technology, Energy & Safety, N.C.S.R. Demokritos w Atenach oraz dr Yuriy Stetsyshyn z the Politechniki Lwowskiej.

W okresie studiów doktoranckich byłem stypendystą programu „Doctus – Małopolski fundusz stypendialny dla doktorantów” (2010-2013) oraz laureatem Stypendium Specjalnego im. Mariana Smoluchowskiego dla doktorantów Krakowskiego Konsorcjum Naukowego „Materia – Energia-Przyszłość”.

Po uzyskaniu stopnia doktora

Po zakończeniu studiów doktoranckich pracowałem w Instytucie Fizyki UJ najpierw na stanowisku asystenta (2013 – 2016) a następnie adiunkta (2016 – obecnie), kontynuując badania nad charakterystyką różnego typu powierzchni, koncentrując się na materiałach organicznych i ich oddziaływaniu z białkami, komórkami i bakteriami w aspekcie zastosowań biomedycznych jak również w „plastikowej” elektronice.

Moje badania skupiły się w znacznej części na polimerach sprzężonych. Byłem kierownikiem dwóch projektów finansowanych przez NCN (UMO-2011/03/N/ST5/04764) oraz MNiSW (0001/IP3/2015/2015/73). Celem pierwszego projektu przyznanego przez NCN („Immobilizacja białek do powierzchni warstw i mikrowzorów polimerów sprzężonych w aspekcie zastosowań w biosensorach”) była analiza orientacji i konformacji białek osadzonych na powierzchniach cienkich warstw polimerów sprzężonych. Wyniki tych badań przedstawiono w przedłożonym opisie celu naukowego i uzyskanym wyników w Sekcji II. *Oddziaływanie białek z powierzchnią polimeru sprzężonego w aspekcie zastosowań w nowych biosensorach [H1, H5 i H9]*. Drugi projekt wspierany przez MNiSW koncentrował się na opracowaniu nowej metody i urządzenia, które umożliwiają tworzenie warstwy polimerowej w kontrolowany sposób. Urządzenie bazuje na metodzie „horizontal

dipping”, gdzie niewielka ilość roztworu jest umieszczana pomiędzy walcem i podłożem, które poruszają się względem siebie dzięki sterowanemu komputerowo przesuwowi liniowemu. W proponowanej metodzie między przewodzące podłoże a elektrodę wytworzoną na walcu przykładany jest prąd zmienny lub stały. Prostopadłe pole elektryczne wpływa na separację faz zachodzącą w mieszaniu polimerów sprzężonego i izolującego umożliwiając tworzenie warstwy polimerowej z obszarami o określonej strukturze bez żadnych dodatkowych kroków. Efektem projektu jest opatentowana metoda (P.418951) tworzenia cienkich warstw polimerowych kompatybilna z technologią roll-to-roll. Technologia ta umożliwia również kontrolę osadzania tlenków metali, np. dwutlenek tytanu i została zastosowana do wytworzenia barwnikowych ogniw słonecznych (DSSC). W innej wersji opracowanego systemu następuje skupienie wiązki światła w menisku utworzonym między walcem i podłożem w wyniku czego następuje inicjacja fotoreakcji w określonym miejscu na podłożu. W rezultacie urządzenie działa jako drukarka metalicznych linii przewodzących. Badania te zaowocowały trzema międzynarodowymi (PCT/EP2019/055935, PCT/EP2018/083248, PCT/EP2019/056361) i czterema polskimi (P.423691, P.425045, P.425043 i P.425002) zgłoszeniami patentowymi.

W okresie po doktoracie kontynuowałem również współpracę z dr Yurijem Stetsyshynem dotyczącą syntezy i charakterystyki nowego typu pokryć polimerowych, tworzonych na bazie szczotek polimerowych. Badania te zaowocowały 9 publikacjami oraz polskim (P.424734) i międzynarodowym (PCT/PL2019/050013) zgłoszeniem patentowym. Zgłoszenia patentowe dotyczą jeszcze niepublikowanych wyników, prezentujących termoprzelączalne właściwości antybakteryjne szczotek POEGMA i P4VP z nanocząstkami Ag, aktywowanymi spontanicznie powyżej ich temperatury przejścia LCST i prowadzących do eliminacji wszystkich bakterii w temperaturze 37 °C.

Dzięki mojemu doświadczeniu w prowadzeniu badań z wykorzystaniem różnych technikach mikro- i spektro-skopowych mogłem również wspierać moją młodszą koleżankę dr Katarzynę Gajos w jej badaniach nad strukturą i właściwościami powierzchni makromolekularnych oraz ich wzorów do zastosowań biotechnologicznych. Część tych badań została przeprowadzona w ramach projektu europejskiego 7PR FOODSNIFFER, w którym byłem również wykonawcą.

Wspieram również badania prowadzone przez moją starszą koleżankę dr hab. Joannę Raczkowską nad wpływem elastyczności podłoża na zachowanie komórek nowotworowych o różnym stopniu zaawansowania. W ramach prowadzonych badań jestem odpowiedzialny za charakterystykę podłoży przy użyciu metody ToF-SIMS [P17, P18 i P26].

Jestem także odpowiedzialny za analizę PCA widm ToF-SIMS otrzymanych dla komórek nowotworowych w ramach prac prowadzonych we współpracy z prof. Małgorzatą Lekką (IFJ PAN, Kraków, Polska) [P16, P19, P23, P25]. PCA zastosowano do analizy całego spektrum masowego bez wstępnej selekcji poszczególnych sygnałów co pozwoliło na rozróżnienia różnych typów komórek nowotworowych. Nasze odkrycia pokazują, że inwazyjny fenotyp ludzkich komórek raka pęcherza moczowego może być skorelowany ze zmianami składu chemicznego komórek.

Podczas moich wizyt w the National Centre for Scientific Research "Demokritos" w Atenach poznałem dr Evangelosa Gogolidesa, co zaowocowało współpracą nad wspólnym projektem dotyczącym charakterystyki powierzchni modyfikowanych plazmą [H3, H6 i P11].

W okresie po doktoracie otrzymałem „Stypendium dla wybitnych młodych naukowców” przyznawane przez MNiSW (2018), jak również zostałem uhonorowany dwukrotnie zespołową Nagrodą Rektora I stopnia za osiągnięcia naukowe (2015 i 2017).

Równolegle do badań naukowych, moje obowiązki obejmują również prowadzenie zajęć dydaktycznych na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego. W 2016 roku przygotowałem i prowadzę jako wykładowca nowy kurs „Biosensory” (15 h) dla studentów Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ. Jestem również wykładowcą kursu „Podstawy fizyki fazy skondensowanej” (30 h) (2018/2019) oraz prowadzę wykład prezentujący metody oparte na spektrometrii mas (15 h) w ramach kursu „Metody fizyczne w biologii i medycynie I” (od 2017). Prowadziłem również liczne laboratoria i zajęcia rachunkowe dla studentów WFAIS oraz byłem promotorem pracy licencjackiej i magisterskiej.

Bibliografia:

- (1) Wei, Q.; He, J.; Zhao, W.; Chen, Y. *Int. J. Polym. Sci.* **2017**, 2017, 1–2.
- (2) <https://www.britannica.com/science/interface-physics>.
- (3) Gooding, J.; Parker, S.; Lu, Y.; Gaus, K. *Langmuir* **2014**, 30, 3290–3302.
- (4) Okano, T.; Yamada, N.; Sakai, H.; Sakurai, Y. *J. Biomed. Mater. Res.* **1993**, 27, 1243–1251.
- (5) Jonkheijm, P.; Weinrich, D.; Schröder, H.; Niemeyer, C. M.; Waldmann, H. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, 47, 9618–9647.
- (6) Magliulo, M.; De Tullio, D.; Vikholm-Lundin, I.; Albers, W. M.; Munter, T.; Manoli, K.; Palazzo, G.; Torsi, L. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, 408, 3943–3952.
- (7) Gerard, M.; Chaubey, A.; Malhotra, B. D. **2002**, 17, 345–359.
- (8) Clancy, K. F. A.; Dery, S.; Laforte, V.; Shetty, P.; Juncker, D.; Nicolau, D. V. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, 130, 397–407.
- (9) Welch, N. G.; Scoble, J. A.; Muir, B. W.; Pigram, P. J. *Biointerphases* **2017**, 12.
- (10) Trilling, A.; Beekwilder, J.; Zuilhof, H. *Analyst* **2013**, 138, 1619–1627.
- (11) Wang, H.; Castner, D. G.; Ratner, B. D.; Jiang, S. *Langmuir* **2004**, 20, 1877–1887.
- (12) Liu, F.; Dubey, M.; Takahashi, H.; Castner, D. G.; Grainger, D. W. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 2947–2958.
- (13) Bañuls, M.-J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. *Anal. Chim. Acta* **2013**, 777, 1–16.
- (14) Siow, K. S.; Britcher, L.; Kumar, S.; Griesser, H. J. *Plasma Process. Polym.* **2006**, 3, 392–418.
- (15) Chu, P. .; Chen, J. .; Wang, L. .; Huang, N. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **2002**, 36, 143–206.
- (16) Mccullough, B. R. D. **1998**, 93–116.

- (17) Khan, H. U.; Roberts, M. E.; Johnson, O.; Förch, R.; Knoll, W.; Bao, Z. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 4452–4456.
- (18) Hammock, M. L.; Knopfmacher, O.; Naab, B. D.; Tok, J. B. H.; Bao, Z. *ACS Nano* **2013**, *7*, 3970–3980.
- (19) Seshadri, P.; Manoli, K.; Schneiderhan-Marra, N.; Anthes, U.; Wierzchowiec, P.; Bonrad, K.; Di Franco, C.; Torsi, L. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *104*, 113–119.
- (20) Lin, P.; Yan, F. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 34–51.
- (21) Bartic, C.; Campitelli, A.; Borghs, S. *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *82*, 475–477.
- (22) Yan, F.; Mok, S. M.; Yu, J.; Chan, H. L. W.; Yang, M. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1241–1245.
- (23) Roach, P.; Farrar, D.; Perry, C. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8168–8173.
- (24) Tajima, N.; Takai, M.; Ishihara, K. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1969–1976.
- (25) Zhao, X.; Pan, F.; Cowsill, B.; Lu, J. R.; Garcia-Gancedo, L.; Flewitt, A. J.; Ashley, G. M.; Luo, J. *Langmuir* **2011**, *27*, 7654–7662.
- (26) Lebec, V.; Boujday, S.; Poleunis, C.; Pradier, C.-M. M.; Delcorte, A. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 2085–2092.
- (27) Chen, S.; Liu, L.; Zhou, J.; Jiang, S. *Langmuir* **2003**, *19*, 2859–2864.
- (28) Gajos, K.; Petrou, P.; Budkowski, A.; Awsiuk, K.; Bernasik, A.; Misiakos, K.; Rysz, J.; Raptis, I.; Kakabakos, S. *Analyst* **2015**, *140*, 1127–1139.
- (29) Mavrogiannopoulou, E.; Petrou, P. S.; Koukouvinos, G.; Yannoukakos, D.; Siafaka-Kapadai, A.; Fornal, K.; Awsiuk, K.; Budkowski, A.; Kakabakos, S. E. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2015**, *128*.
- (30) Awsiuk, K.; Rysz, J.; Petrou, P.; Budkowski, A.; Bernasik, A.; Kakabakos, S.; Marzec, M. M.; Raptis, I. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *290*.
- (31) Cho, I.-H.; Park, J.-W.; Lee, T. G.; Lee, H.; Paek, S.-H. *Analyst* **2011**, *136*, 1412–1419.
- (32) Cho, I.; Paek, E.; Lee, H.; Yoon, J.; Song, T.; Paek, S. **2007**, *365*, 14–23.
- (33) Erb, T.; Zhokhavets, U.; Gobsch, G.; Raleva, S.; Stühn, B.; Schilinsky, P.; Waldauf, C.; Brabec, C. J. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 1193–1196.
- (34) Michel, R.; Pasche, S.; Textor, M.; Castner, D. G. *Langmuir* **2005**, *21*, 12327–12332.
- (35) Tidwell, C. D.; Castner, D. G.; Golledge, S. L.; Ratner, B. D.; Meyer, K.; Hagenhoff, B.; Benninghoven, A. *Surf. Interface Anal.* **2001**, *31*, 724–733.
- (36) Michel, R.; Castner, D. G. *Surf. Interface Anal.* **2006**, *38*, 1386–1392.
- (37) Mouhib, T.; Delcorte, a.; Poleunis, C.; Henry, M.; Bertrand, P. *Surf. Interface Anal.* **2010**, *42*, 641–644.
- (38) Monera, O. D.; Sereda, T. J.; Zhou, N. E.; Kay, C. M.; Hodges, R. S. *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 319–329.
- (39) Huang, Y.-W.; Gupta, V. K. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 2264–2271.

- (40) Kosobrodova, E.; Jones, R. T.; Kondyurin, A.; Chrzanowski, W.; Pigram, P. J.; McKenzie, D. R.; Bilek, M. M. M. *Acta Biomater.* **2015**, *19*, 128–137.
- (41) Eisenberg-Domovich, Y.; Hytönen, V. P.; Wilchek, M.; Bayer, E. A.; Kulomaa, M. S.; Livnah, O. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2005**, *61*.
- (42) Macchia, E.; Alberga, D.; Manoli, K.; Mangiatordi, G. F.; Magliulo, M.; Palazzo, G.; Giordano, F.; Lattanzi, G.; Torsi, L. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28085.
- (43) Green, N. S.; Pass, K. A. *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 147–151.
- (44) Palacios, G.; Quan, P.-L.; Jabado, O. J.; Conlan, S.; Hirschberg, D. L.; Liu, Y.; Zhai, J.; Renwick, N.; Hui, J.; Hegyi, H.; Grolla, A.; Strong, J. E.; Towner, J. S.; Geisbert, T. W.; Jahrling, P. B.; Büchen-Osmond, C.; Ellerbrok, H.; Sanchez-Seco, M. P.; Lussier, Y.; Formenty, P.; Nichol, S. T.; Feldmann, H.; Briesse, T.; Lipkin, W. I. *Emerg. Infect. Dis.* **2007**, *13*, 73–81.
- (45) Gall, A.; Hoffmann, B.; Harder, T.; Grund, C.; Ehricht, R.; Beer, M. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 2985–2988.
- (46) Roy, D.; Cambre, J. N.; Sumerlin, B. S. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 278–301.
- (47) Theato, P.; Sumerlin, B. S.; O'reilly, R. K.; Epp III, T. H. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7055–7056.
- (48) Lendlein, A.; Behl, M.; Hiebl, B.; Wischke, C. *Expert Rev. Med. Devices* **2010**, *7*, 357–379.
- (49) Luzinov, I.; Minko, S.; Tsukruk, V. V. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 635–698.
- (50) Barbey, R.; Lavanant, L.; Paripovic, D.; Schüwer, N.; Sugnaux, C.; Tugulu, S.; Klok, H.-A. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5437–5527.
- (51) Kalay, S.; Stetsyshyn, Y.; Lobaz, V.; Harhay, K.; Ohar, H.; Çulha, M. *Nanotechnology* **2015**, *27*.
- (52) Cavallaro, G.; Lazzara, G.; Massaro, M.; Milioto, S.; Noto, R.; Parisi, F.; Riela, S. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 8944–8951.
- (53) Bittrich, E.; Burkert, S.; Müller, M.; Eichhorn, K. J.; Stamm, M.; Uhlmann, P. *Langmuir* **2012**, *28*, 3439–3448.
- (54) Stetsyshyn, Y.; Raczowska, J.; Budkowski, A.; Kostruba, A.; Harhay, K.; Ohar, H.; Awsiuk, K.; Bernasik, A.; Ripak, N.; ZemŁa, J. *Langmuir* **2015**, *31*.
- (55) Raczowska, J.; Stetsyshyn, Y.; Awsiuk, K.; ZemŁa, J.; Kostruba, A.; Harhay, K.; Marzec, M.; Bernasik, A.; Lishchynskyy, O.; Ohar, H.; Budkowski, A. *RSC Adv.* **2016**, *6*.
- (56) Peng, B.; Johannsmann, D.; R  he, J. *Macromolecules* **1999**, *32*, 6759–6766.
- (57) Raczowska, J.; Stetsyshyn, Y.; Awsiuk, K.; Lekka, M.; Marzec, M.; Harhay, K.; Ohar, H.; Ostapiv, D.; Sharan, M.; Yaremchuk, I.; Bodnar, Y.; Budkowski, A. *Appl. Surf. Sci.* **2017**, *407*.
- (58) Stetsyshyn, Y.; Raczowska, J.; Budkowski, A.; Awsiuk, K.; Kostruba, A.; Nastyshyn, S.; Harhay, K.; Lychkovskyy, E.; Ohar, H.; Nastishin, Y. *Langmuir* **2016**, *32*.
- (59) Keddie, J. L.; Jones, R. A. L.; Cory, R. A. *EPL* **1994**, *27*, 59–64.
- (60) Balazs, A. C.; Emrick, T.; Russell, T. P. *Science (80-.)* **2006**, *314*, 1107–1110.
- (61) Fava, D.; Winnik, M. A.; Kumacheva, E. *Chem. Commun.* **2009**, 2571–2573.
- (62) Ding, T.; R  ttiger, C.; Zheng, X.; Benz, F.; Ohadi, H.; Vandenbosch, G. A. E.; Moshchalkov, V.

- V; Gallei, M.; Baumberg, J. J. *Adv. Opt. Mater.* **2016**, *4*, 877–882.
- (63) Manikas, A. C.; Romeo, G.; Papa, A.; Netti, P. A. *Langmuir* **2014**, *30*, 3869–3875.
- (64) Raza, M. A.; Kanwal, Z.; Rauf, A.; Sabri, A. N.; Riaz, S.; Naseem, S. *Nanomaterials* **2016**, *6*.
- (65) Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1712–1720.
- (66) Khodashenas, B.; Ghorbani, H. R. *Arab. J. Chem.* **2015**.
- (67) Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 76–83.
- (68) Lue, J.-T. *J. Phys. Chem. Solids* **2001**, *62*, 1599–1612.
- (69) Evanoff Jr., D. D.; Chumanov, G. *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 1221–1231.
- (70) Benetti, E. M.; Sui, X.; Zapotoczny, S.; Julius Vancso, G. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 939–944.
- (71) Gupta, S.; Uhlmann, P.; Agrawal, M.; Chapuis, S.; Oertel, U.; Stamm, M. *Macromolecules* **2008**, *41*, 2874–2879.
- (72) Gupta, S.; Agrawal, M.; Conrad, M.; Hutter, N. A.; Olk, P.; Simon, F.; Eng, L. M.; Stamm, M.; Jordan, R. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 1756–1761.
- (73) Luengo, G.; Pan, J.; Heuberger, M.; Israelachvili, J. N. *Langmuir* **1998**, *14*, 3873–3881.
- (74) Rogers, S. S.; Mandelkern, L. *J. Phys. Chem.* **1957**, *61*, 985–990.
- (75) Stetsyshyn, Y.; Raczowska, J.; Lishchynskiy, O.; Bernasik, A.; Kostruba, A.; Harhay, K.; Ohar, H.; Marzec, M. M.; Budkowski, A. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 12035–12045.
- (76) Zemła, J.; Lekka, M.; Wiltowska-Zuber, J.; Budkowski, A.; Rysz, J.; Raczowska, J. *Langmuir* **2008**, *24*, 10253–10258.
- (77) Rezwan, K.; Meier, L. P.; Rezwan, M.; Vörös, J.; Textor, M.; Gauckler, L. J. *Langmuir* **2004**, *20*, 10055–10061.

